

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie  
der Philipps- Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. R. Happle

Abteilung für Andrologie  
Leiter: Prof. Dr. med. W. Krause

## **Auswertung diagnostischer Verfahren bei Borrelienerkrankung**

Inaugural- Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps- Universität  
Marburg vorgelegt von:

Simone Barbara Hummler  
aus Bad Soden/ Taunus

Marburg, November 2001

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps- Universität  
Marburg am 21.03.02

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. R. Arnold

Referent: Prof. Dr. med. W. Krause

Correferent: Prof. Dr. M. Lohoff

# Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	5
I.1. Vorkommen und Klassifikation der Borreliosen.....	9
I.1.1. Übertragungsmechanismen und Lebenszyklus von Borrelia .....	11
Burgdorferi.....	11
I.2. Klinische Symptomatik.....	13
I.3. Therapie bei Borrelieninfektion .....	17
I.4. Prävention der Borrelieninfektion .....	18
I.4.1. Impfstoffentwicklung.....	20
I.5. Diagnose der Borrelieninfektion .....	21
I.6. Empfehlungen der WHO (World Health Organisation) und des CDC (Center of Disease Control) zur Verbesserung der Diagnose bei Borrelieninfektion (WHO, 1995, S.141): .....	31
II. Ziel und Fragestellung der Studie .....	34
III. Methodik.....	35
III.1. Datenerhebung.....	35
III.1.1. Datenschutz .....	37
III.2. Patientenkollektiv .....	37
III.2.1. Ein- und Ausschlußkriterien des zu untersuchenden Patientenkollektivs: .....	37
III.2.2. Stichprobenumfang und Zielvariable .....	38
III.3. Untersuchungstechnik.....	39
III.3.1. Technische Geräte und Material.....	39
III.3.2. Untersuchungsablauf.....	41
III.3.3. Auswertung der verwendeten Testverfahren IFT und WB .....	45
III.4. Statistische Analyse der Daten.....	52
IV. Ergebnisse.....	54
IV.1. Zusammengefaßte Darstellung der erhobenen Daten.....	54

IV.2. Ergebnisse im Einzelnen.....	56
V. Schlußbetrachtung .....	74
VI. Zusammenfassung.....	82
VII. Anhang .....	84
VII.1. Literaturverzeichnis.....	84
VII.2. Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	87
VII.3. Danksagung .....	88

## **I. Einleitung**

Willy Burgdorfer gelang 1981 die Isolierung eines Bakteriums aus der Familie der Spirochäten. Das Bakterium wurde nach ihm *Borrelia burgdorferi* benannt und wird für die weltweit vorkommende Borrelienkrankheit verantwortlich gemacht.

Die Diagnose dieser Multisystemerkrankung stützt sich auf verschiedene Pfeiler, nämlich Anamnese, klinische Untersuchung und auf serologische Untersuchungen.

Die Auswertung der serologischen Diagnoseverfahren wie Immunfluoreszenztest und Westernblot bereitet aufgrund fehlender Standardisierung noch immer Schwierigkeiten, so daß die serologischen Untersuchungen die klinische Diagnose unterstützen, sie aber nicht ersetzen können.

Wenn eine Infektion mit Borrelien einen typischen klinischen Verlauf hat und sich z.B. durch ein Erythema migrans manifestiert, gibt es keine Schwierigkeiten eine Diagnose zu stellen. Da sich bei Borrelienkrankheiten aber sehr unterschiedliche Verläufe mit unterschiedlichster Beteiligung von einzelnen Organsystemen gezeigt haben, ist die Diagnose bei diesen atypischen Verläufen auch für erfahrene Ärzte schwierig. Deshalb ist es um so wichtiger, eine Standardisierung der Labordiagnostik zu erstellen, um mit den serologischen Testverfahren ein zusätzliches diagnostisches Mittel zu haben.

Bisher wurden in Europa drei Spezies von *Borrelia burgdorferi* sensu lato mit humanpathogener Wirkung beschrieben. Diese drei unterschiedlichen Borrelienstämme haben verschiedene Antigenstrukturen, die einen serologischen Antikörpernachweis erschweren.

In Nordamerika, wo die Lyme-Borreliose lediglich durch *Borrelia burgdorferi* sensu stricto ausgelöst wird, ist die Antigenvariabilität geringer.

Da in den USA dennoch ähnliche Probleme bei dem

Serumantikörpernachweis auftraten, startete 1994 das CDC (Center of Disease Control) eine nationale Kampagne zur Etablierung eines allgemein gültigen Standards in der serologischen Diagnostik der Lyme- Borreliose.

Zuerst wurde eine nationale Serumprobenbank eingerichtet, in der sowohl Seren von an Borreliose erkrankten Personen gesammelt wurden, als auch von gesunden Kontrollpersonen. Von den verwendeten Testverfahren erbrachte kein einzelner Test die von der WHO (World Health Organisation) geforderte Spezifität von 98% bzw. eine entsprechend hohe Sensitivität. Deshalb hat man in den USA ein zwei- Testverfahren etabliert, welches eine Verbesserung der Nachweisgenauigkeit bietet. Als Screeningtest wird ein Immunfluoreszenztest oder ein ELISA (enzyme- linked immunosorbent assay) durchgeführt, der bei positivem oder grenzwertigem Ergebnis durch einen Westernblot ergänzt wird.

Für den Westernblot wurden für Immunglobulin G und Immunglobulin M Positivitätskriterien festgelegt.

Außerdem wurden die Stämme, die geeignete Antigene für den Antikörpernachweis exprimieren, festgelegt.

Probleme in der Diagnostik stellen die auftretenden Kreuzreaktionen zwischen Oberflächenantigenen von bestimmten Bakterien (gramnegative Enterobakterien, Treponemen, Leptospiren, *Borrelia recurrentis*, etc.) und *Borrelia burgdorferi* dar. So kann z. B. aufgrund der fast identischen Flagellen eine Kreuzreaktion zwischen *Treponema pallidum* und Borrelienantikörpern zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Das Ergebnis muß durch einen TPHA-Test (*Treponema pallidum* Hämagglutinations- Test) kontrolliert werden.

Falsch positive Ergebnisse sind auch bei frischen EBV (Epstein- Barr- Virus)- Infektionen aufgetreten. Die Ergebnisse können durch einen Westernblot abgeklärt werden.

Probleme in der Diagnostik werden auch durch unterschiedliche Titerhöhen hervorgerufen. So kann die Höhe der Antikörpertiter für IgG (Immunglobulin G) und IgM (Immunglobulin M) mit dem klinischen Krankheitsbild korrelieren,

es können aber auch niedrige Antikörpertiter bei einer klinisch schwer verlaufenden Borreliose auftreten.

Ebenso können hohe Antikörpertiter bei klinisch leichtem Verlauf nachweisbar sein.

In den Frühphasen einer Infektion kann ein Antikörpernachweis fehlen, da bei der häufig zuerst lokalen Infektion (Erythema migrans in 10- 30% der Fälle positiv) der Körper noch keine Immunantwort gebildet hat. Es ist dann keine serologische Diagnose möglich. Im disseminierten Stadium sind gewöhnlich IgM- Antikörper nachweisbar. Ursache für das Fehlen von IgG- Antikörpern ist der sogenannte IgM- IgG- Antikörper- Switch, der Folge einer somatischen Deletionsmutation in B- Lymphozyten- Genomen ist. Es wird vermutet, daß später nachweisbare IgM- Antikörper durch die Präsentation von neuen Epitopen entstehen, die immunogene Potenz besitzen.

Bei immunsupprimierten Patienten ist der Nachweis von Antikörpern aufgrund der allgemein unterdrückten Immunantwort im Regelfall nicht möglich.

Durch eine frühzeitige Antibiotikatherapie kann beim Auftreten eines Erythema migrans die Antikörperantwort des Körpers unterdrückt werden. Zu Beginn der Infektion schwach nachweisbare IgM- Antikörper können unter die Nachweisgrenze absinken und eine Serokonversion in IgG- Antikörper kann vollständig ausbleiben.

Die mit den Tests nachgewiesenen Antikörper bieten dem Körper keine Immunität bei Reinfektion. Diese Tatsache läßt sich darauf zurückführen, daß es aufgrund der Heterogenität der Borrelienstämme fast unmöglich ist, daß sich ein Patient zweimal mit dem gleichen Erreger infiziert. Außerdem kann noch keine Aussage darüber gemacht werden, wie lange die einmal gebildeten Antikörper im Körper zirkulieren. Bei der Bewertung der Testergebnisse sollte man stets die Möglichkeit vorheriger Infektionen (Seronarben) in Betracht ziehen, was sich im Westernblot durch den Nachweis von bestimmten spät

auf tretenden Banden wie z.B. 100, 93, 88, 83 kD (Kilodalton) - Banden widerspiegelt.

IgM- Antikörper können persistieren. Es wird in Einzelfällen beschrieben, daß IgM- Antikörper noch bis zu zwei Jahre nach einer Borrelieninfektion vorhanden waren, ohne daß dazu ein klinisches Korrelat gefunden werden konnte.

Die Darstellung der unterschiedlichen Faktoren, die die Ergebnisse der serologischen Testverfahren beeinflussen, macht die Notwendigkeit einer Standardisierung der einzelnen Testverfahren deutlich.

In der vorliegenden Studie werden die in der Dermatologischen Klinik in Marburg angewandten serologischen Testverfahren, nämlich Immunfluoreszenztest und Westernblot, hinsichtlich Sensitivität und Spezifität ausgewertet. Es wird mit Hilfe des statistischen Verfahrens der binär logistischen Regression überprüft, ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der angewandten Testverfahren und dem jeweiligen klinischen Krankheitsstadium der Borrelienkrankheit besteht.

Zusätzlich wird überprüft, ob eine Korrelation zwischen einer Infektion mit Borrelien und der Erkrankung an Morphea besteht und es werden die Häufigkeitsverteilungen der jeweiligen Krankheitsbilder in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und serologischem Testergebnis dargestellt.



## **I.1. Vorkommen und Klassifikation der Borreliosen**

Bei den Borreliosen handelt es sich um eine von Schildzecken (*Ixodes ricinus* in Mitteleuropa und *Ixodes dammini* in den USA) übertragene bakterielle Infektionskrankheit. Zuerst beobachtet wurde die Erkrankung im Bezirk Lyme im US- Bundesstaat Connecticut, wo 1975 bei Kindern gehäuft Arthritiden auftraten, die dann als Lyme- Arthritis bezeichnet wurden.

1981 isolierte Willy Burgdorfer aus der Zeckenspezies *Ixodes ricinus* das zur Familie der Spirochäten gehörende *Borrelia burgdorferi*- Bakterium. Es handelt sich dabei um bewegliche Bakterien mit 7- 11 Flagellen, die jeweils an den Enden des Bakteriums sitzen und von einer periplasmatischen Hülle umgeben sind. Das Bakterium hat eine Länge von 8- 30  $\mu\text{m}$  und ist somit deutlich größer als Treponemen oder Leptospiren, zu denen eine enge Verwandtschaft besteht (ebenfalls Familie der Spirochäten).

*Borrelia burgdorferi* ist ein gramnegatives, mikroaerophiles Bakterium, das sich nach Giemsa oder Warthin- Starry anfärben läßt. Bei einem Durchmesser von 0,2 bis 0,5  $\mu\text{m}$  besteht es aus 1,5- 3,8  $\mu\text{m}$  langen Windungen, die nicht konstant sind.

Es trägt ein lineares Chromosom, welches alle für die Funktion des Bakteriums wichtigen Gene enthält und mehrere zirkuläre Plasmide, die z.B. Informationen für die „outer surface proteins“ tragen.

Mittlerweile wurden aus Zecken der Spezies *Ixodes* mehr als zehn verschiedene Borrelienbakterien isoliert. Die drei humanpathogenen Erreger, die als Überträger der Borrelienkrankheit bestätigt wurden, sind *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii* und *Borrelia garinii*. Sie werden unter dem Oberbegriff *Borrelia burgdorferi sensu lato* zusammengefaßt. Während in Europa alle drei Borrelien- Spezies vorhanden sind und von *Ixodes ricinus* und *Ixodes persulcatus* übertragen werden, trifft man in Nordamerika

ausschließlich auf *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, die durch *Ixodes scapularis* und *Ixodes pacificus* übertragen werden.

In Ostasien konnten bisher *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii* nachgewiesen werden, deren Vektor *Ixodes persulcatus* ist.

Für die weiteren *Borrelienspezies*, die bisher isoliert wurden, konnte keine Humanpathogenität festgestellt werden.

Die folgende Tabelle bietet eine Übersicht über die verschiedenen *Borrelienspezies* und über die unterschiedlichen Vektoren:

<i>Geographische Verbreitung</i>	<i>Borrelien- Art</i>	<i>Vektor</i>	<i>Pathogenität</i>
Nordamerika	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	<i>I. scapularis</i> <i>I. pacificus</i>	+ +
	<i>Borrelia andersonii</i>	<i>I. dentatus</i>	-
	Group DN 127	<i>I. pacificus</i>	-
Europa, West-Rußland	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	<i>I. ricinus</i>	+
	<i>Borrelia garinii</i>	<i>I. persulcatus</i> , <i>I. ricinus</i>	+
	<i>Borrelia afzelii</i>	<i>I. persulcatus</i> , <i>I. ricinus</i>	+
	Group VS 116	<i>I. persulcatus</i> , <i>I. ricinus</i>	?
	Group Poti B2	<i>I. ricinus</i>	?
Ost- Rußland, Ost-Asien	<i>Borrelia garinii</i>	<i>I. persulcatus</i>	+
	<i>Borrelia afzelii</i>	<i>I. persulcatus</i>	+
Arktische und Antarktische Zonen	<i>Borrelia garinii</i>	<i>I. uriae</i>	+
Japan	<i>Borrelia garinii</i>	<i>I. persulcatus</i>	+
	<i>Borrelia afzelii</i>	<i>I. persulcatus</i>	+
	<i>Borrelia japonica</i>	<i>I. ovatus</i>	?
	<i>Borrelia miyamotoi</i>	<i>I. persulcatus</i>	-

**Tabelle 1:** Talaska, 1998 a, S. 13

## **I.1.1. Übertragungsmechanismen und Lebenszyklus von Borrelia**

### **Burgdorferi**

Die Übertragung der Borrelien erfolgt von der Zecke zum Menschen auf hämatogenem Weg. Bis es zu einer Übertragung von Borrelien kommt, wird ein langer Weg durchlaufen.

Der Erreger *Borrelia burgdorferi* zirkuliert zwischen Vektoren und Reservoirwirten. Als Vektoren dienen Schildzecken der Gattung *Ixodes* (in Westeuropa *Ixodes ricinus* und *Ixodes persulcatus*). Je nach Standort wird eine Durchseuchungsrate der *Ixodes*- Larven mit *Borrelia burgdorferi* von 0- 5% angenommen. Für die Nymphen schwanken die Angaben zwischen 5- 30% und für das adulte Stadium der Zecken wird eine noch höhere Durchseuchungsrate angenommen. Als Reservoirwirte dienen je nach ökologischem Gebiet Kleinnager wie Waldmaus, Rötelmaus, Brandmaus und Gelbhalsmaus, sowie einige Arten der Insectivora- Spezies wie Igel und Spitzmaus. Bisher ist nicht geklärt, ob auch Eichhörnchen und einige Vogelarten als Reservoirwirte von Bedeutung sind.

Zum Lebenskreislauf der *Ixodes*- Zecke:

Die *Ixodes*- Zecke benötigt ein feuchtes Klima, um während der nicht parasitischen, d.h. blutmahlzeitfreien Intervalle überleben zu können. Dazu kann verrottetes Laub aus Laub- und Mischwaldflächen dienen, das ganzjährig ein stabiles Feuchtreservoir für die *Ixodes*- Zecken bietet.

Vor allem in den Monaten von März bis Oktober suchen die Zecken einen Wirt und sind dann überwiegend an gut zugänglichen Orten wie langen Grashalmen, Blättern und Sträuchern zu finden. Der Schlüsselreiz für eine blutsaugende Zecke, sich auf einen Wirt, d.h. auf ein Säugetier fallen zu lassen, ist die Wahrnehmung des Geruchs von Buttersäure beim Wirt. Diese Buttersäure entsteht aus dem Schweiß der Säugetiere.

Zusätzlich ist ein Temperaturreiz, das heißt eine Mindestaußentemperatur von 6 Grad Celsius notwendig.

In den restlichen Monaten, d.h. von November bis Februar, sind Zeckenstiche unwahrscheinlich, es sei denn, es handelt sich um einen ausgesprochen milden Winter.

Normalerweise haben Zecken der Gattung Ixodes einen zweijährigen Lebenskreislauf. Dabei werden die Stadien Ei, Larve, Nymphe und adulte Zecke durchlaufen. Das adulte Ixodes- Weibchen legt im Frühjahr 2000 bis 3000 Eier, die dann bis zum Herbst zu Nymphen heranreifen. Im darauffolgenden Frühling bzw. Sommer werden die Nymphen aktiv und suchen sich als Wirte Menschen, Mäuse, Wild, Vögel und andere Vertebraten. Die Nymphen haben eine größere Chance als die adulten Zecken, Borrelien von infizierten Wirtstieren zu übernehmen und eine Infektion zu übertragen, weil sie zum einen im Frühling und Sommer sehr viel aktiver sind als die adulten Tiere und aufgrund ihrer geringeren Größe häufig erst sehr spät bemerkt werden. Eine Infektion hat dann oft bereits stattgefunden. Die adulten Tiere zeigen im Herbst nochmals eine aktive Phase, in der sie sich für den Winter einen Wirt suchen, um dann im Frühjahr wieder Eier zu legen.

Obwohl, wie oben beschrieben, die Durchseuchungsrate mit Borrelien in manchen Regionen sehr hoch ist, kommt es nicht durch jeden Zeckenstich zu einer Infektion. Dies ist darin begründet, daß der Saugakt der Zecke eine gewisse Zeit in Anspruch nehmen muß, bis die Borrelien vom Darm der Zecke in die Speicheldrüsen gelangen können. Dies geschieht selten in einem Zeitraum unter 24 Stunden.

Wird die Zecke vorher entfernt, kommt es nicht zu einer Borrelieninfektion.

## I.2. Klinische Symptomatik

Borreliosen sind Multisystemerkrankungen, die Haut-, Muskel- und Skelettsystem, Zentrales Nervensystem (ZNS) und Peripheres Nervensystem (PNS), lymphatisches System, Herz und Augen einbeziehen können. Die Erkrankung läßt sich in drei verschiedene Stadien einteilen, für die jeweils bestimmte klinische Symptome typisch sind. Oft sind die Übergänge fließend und eine genaue Stadieneinteilung ist sehr schwierig.

In der folgenden Tabelle wird ein Überblick über das vielfältige Krankheitsbild gegeben:

	<i>Stadium 1</i>	<i>Stadium 2</i>	<i>Stadium 3</i>
uncharakteristische Beschwerden	Kopfschmerzen, Fieber, Myalgien, reg. Lymphknotenschwellung		
Latenzzeit	5- 40 Tage	3 Wochen bis 3 Monate	Monate bis Jahre
Haut	Erythema migrans (ECM)	multiple ECM-Läsionen, Lymphadenitis cutis benigna	Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer , evtl. Lichen sclerosus und Morphea, Dermatomyositis-ähnl. Zustandsbild, febrile noduläre Panniculitis
Muskel- und Skelett- System	Arthralgien, Myalgien, Fibromyalgie-Syndrom	Arthritis	rezidivierende Arthritis (chron. progressiv, chron. symmetr. Polyarthritis)

	<i>Stadium 1</i>	<i>Stadium 2</i>	<i>Stadium 3</i>
ZNS/ PNS	Cephalgien	Meningopolyneuritis Garin-Bujadoux-Bannwarth, lymphozytäre Meningitis, uni- o. bilaterale Facialisparese, Sehnervenentzündungen, Augenmuskellähmungen Radikulitis, Myelitis, Neuritis cranialis	Meningoencephalitis, Meningomyeloencephalitis, Polyneuropathie
lymphat. System	Lymphadenosis cutis benigna		
Herz		Herzrhythmusstörungen, Myokarditis, Perikarditis	als Spätfolge evtl. dilatative Kardiomyopathie
Auge		Chorioretinitis, Iridozyklitis, Keratokonjunktivitis, Augenmuskellähmungen	

**Tabelle 2:** Wolfgang Güthoff, 1998, S. 81

Aufgrund der großen Affinität von *Borrelia burgdorferi* zu Haut und Bindegewebe ist das dermatologische Spektrum bei Borrelieninfektion groß und umfaßt das Erythema migrans, das Borrelienlymphozytom (Lymphadenosis cutis benigna) und die Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer.

Durch Vermehrung in Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen gelangt *Borrelia burgdorferi* in die Blutbahn und von dort ins Bindegewebe, wo die Erreger histologisch und elektronenmikroskopisch

nachgewiesen werden können.

Bei dem Erythema migrans handelt es sich um eine frühe Manifestationsform in der Haut, die häufig als kleiner roter Fleck, Knoten oder Quaddel beginnt und im weiteren Verlauf zentral abblaßt; gleichzeitig setzt sich das Erythema migrans in die Peripherie fort. Das Erythem kann spontan abheilen, oder aber Wochen bis Monate „weiterwandern“ oder rezidivieren.

Bei dem Borrelienlymphozytom handelt es sich um eine weitere Hautmanifestation, die gehäuft bei Kindern zu finden ist. Das Borrelienlymphozytom befindet sich in Form einer blauroten Schwellung bevorzugt am Ohr an der Helix oder im Bereich des Ohrläppchens. Häufige Begleitsymptome sind Abgeschlagenheit und Fieber. Bei Erwachsenen manifestiert sich das Borrelienlymphozytom selten und dann im Bereich der Mamille oder des Skrotums. Differentialdiagnostisch müssen in diesen Fällen maligne Lymphome ausgeschlossen werden.

Bei der Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer, dem Spätstadium der Hautmanifestationen bei Borrelieninfektion, tritt im Verlauf von Jahren aus zunächst hellroten unscharf begrenzten Erythemen, die mit einer ödematösen Verdickung der Haut einhergehen, eine zunehmend streifige oder flächige Hautatrophie auf. Überwiegend ist die Erkrankung an den Streckseiten der Extremitäten lokalisiert und erscheint dort in Form von streifenförmigen Fibrosen oder im Bereich der Ellenbogen häufig als juxtaartikuläre Knoten. Diese sind im Gegensatz zu Rheumaknoten oder Gichttophi nicht schmerzhaft und gut verschieblich. Begleitsymptom der ACAH ist bei ca. 50% der erkrankten Personen eine Begleitneuropathie, die sich in Form von Kribbeln oder Ziehen in den betroffenen Hautabschnitten äußert. Weiteres Begleitsymptom der ACAH kann eine Hyperimmunglobulinämie (insbesondere IgM- Isotyp) sein. Es wurde beobachtet, daß diese in Verbindung mit ACAH zu malignen B- Zell- Lymphomen und zu Immunozytomen der Haut führen kann.

Es gibt weitere dermatologische Erkrankungen, bei denen *Borrelia burgdorferi* aus Gewebe isoliert werden konnte. Ein Zusammenhang zwischen diesen Hauterkrankungen und einer Borrelieninfektion konnte bisher aber nicht zuverlässig bewiesen werden. Dazu gehören Morphea (Synonym: circumscripte Sklerodermie), Dermatomyositis- artiges Zustandsbild, roseoläre Erytheme, febrile noduläre rezidivierende Panniculitis, Granuloma anulare, schnellender Finger, Lichen sclerosus et atrophicus, eosinophile Fasziiitis (Shulman- Syndrom), Raynaud- Syndrom, pigmentierte urtikarielle Erytheme und lymphozytäre Infiltration.

Bei der Morphea handelt es sich um die kutane oder subkutane Form der Sklerodermie. Eine Beteiligung von inneren Organen ist selten. An der Haut entstehen rundliche Herde, die in der Mitte häufig derb sind und in der Peripherie durch einen sogenannten „lilac ring“ (blau- violette Farbe) begrenzt sind.

Eine besondere Form der Morphea ist die Sklerodermie vom Säbelhiebtyp . Dabei findet man vor allem im Bereich der Stirn säbelhiebartig erscheinende Hautveränderungen, die durch fibrosierende und entzündliche Prozesse hervorgerufen werden. An den Extremitäten treten häufiger bandförmige Veränderungen der Haut auf, die ebenfalls auf fibrosierende und entzündliche Prozesse zurückzuführen sind. Die Prognose der Erkrankung ist günstig zu bewerten, wenn sich keine Zeichen einer systemischen Sklerodermie mit entsprechenden Entzündungsparametern (Antikörper gegen Topoisomerase I/ Antizentromerantikörper/ antinukleäre Antikörper) finden. Die Hauterkrankung selbst ist jedoch nur schwierig zu therapieren.

Im Zusammenhang mit dem Auftreten der circumscripten Sklerodermie wurde von einigen Autoren eine häufig gleichzeitig bestehende Seropositivität für Antikörper gegen Borrelien beobachtet.



### I.3. Therapie bei Borrelieninfektion

Der Erreger der Borrelienkrankheit, *Borrelia burgdorferi*, hat eine erhöhte Affinität zu schlecht durchbluteten Körpergeweben und zum zentralen Nervensystem. Dadurch ergeben sich für eine erfolgreiche Therapie der Erkrankung bestimmte Kriterien.

Das gewählte Antibiotikum sollte eine lange Halbwertszeit haben, es sollte einen niedrigen MHK- Wert (minimale Hemmkonzentration) haben und gut in die betroffenen Gewebe penetrieren können. Abhängig vom jeweiligen Stadium der Borrelieninfektion und unter Berücksichtigung eventueller Antibiotikaunverträglichkeiten hat sich folgende Therapie der Erkrankung bewährt:

<b><i>Stadium 1:</i></b> <b>Erythema migrans</b>	
Erste Wahl: Doxycyclin 4 mg/kg KG oral 20 Tage oder Amoxicillin 30- 40 mg/kg KG oral 14- 21 Tage	Bei Allergien: Erythromycin 20- 40mg/kg KG 14- 21 Tage, evtl. Auch Azithromycin oral
<b><i>Stadium 2:</i></b> <b>früh disseminierte Borreliose</b>	
Erste Wahl: Ceftriaxon 25 mg/kg KG i.v. über 14-21 Tage oder Cefotaxim 50 mg/kg KG (2 Dosen i.v. über 10-14 Tage)	Bei Allergien: Erythromycin 25 mg/kg KG i.v.
<b><i>Stadium 3:</i></b> <b>spät disseminierte Infektion</b>	
Erste Wahl: Ceftriaxon 50 mg/ kg KG i.v. über 14- 21 Tage, falls Rezidiv: Wiederholung der Therapie, evtl. höhere Dosierung (z.B. 3×4g Cefotaxim)	

**Tabelle 3:** Hassler, 1998, S. 100

Im Stadium zwei kann es im Rahmen einer diffusen Myokarditis eventuell nötig werden, bei Auftreten von AV-Blockierungen oder Asystolie einen Schrittmacher zu implantieren.

Im Verlauf der Behandlung von Stadium zwei und drei kann es unter der Therapie zu einer vorübergehenden Verschlechterung des Krankheitsbildes kommen, was wahrscheinlich durch Bakterienzerfall hervorgerufen wird und der Jarisch-Herxheimer-Reaktion bei Syphilis ähnelt. In diesem Fall ist die Antibiose für kurze Zeit zu unterbrechen und die Gabe von 100-300 mg Prednisolon gerechtfertigt.

#### **I.4. Prävention der Borrelieninfektion**

Die Borrelienkrankheit tritt in Deutschland je nach Region mit einer Inzidenz von 2-48/100000 Einwohner auf. Diese Daten wurden für das Bundesland Brandenburg im Zeitraum von November 1994 bis November 1996 erhoben. Dabei wird davon ausgegangen, daß ähnlich wie in den USA nur ca. ein Drittel der Erkrankungsfälle erfaßt werden, so daß die tatsächliche Inzidenz höher liegt.

Aufgrund der steigenden Inzidenz der Borreliosen in den letzten Jahrzehnten und der damit wachsenden ökonomischen Bedeutung, sollte man versuchen, die Borreliosen durch geeignete Präventionsmaßnahmen zurückzudrängen.

Diese sollten ökologisch verträglich und mit angemessenem finanziellem Aufwand realisierbar sein.

Folgende Präventionsmaßnahmen werden dabei für Deutschland vorgeschlagen (Talaska, 1998 b, S. 31- 33):

### **1. Persönlicher Schutz:**

Meidung von Hochrisikogebieten wie Mischwälder und Parks, vor allem in der Hauptaktivitätszeit der Zecken von Frühjahr bis Herbst.

Es ist sinnvoll bei Aufenthalt in einem Risikogebiet geschlossene, enganliegende Kleidung (kann mit Kontaktgiften imprägniert werden) und festes Schuhwerk zu tragen, da ein Hautkontakt mit Zecken dann nicht möglich ist.

Die effektivste Präventionsmaßnahme ist eine regelmäßige Entfernung der Zecken aus Kleidung und Haut, da die Borrelien erst während des Saugaktes, der häufig erst 24 bis 36 Stunden nach einem Zeckenstich beginnt, übertragen werden.

### **2. Einsatz von Acariziden:**

Eine sehr effektive, aber ökologisch bedenkliche Methode, um in begrenzten Regionen die Zeckenpopulationen einzudämmen, ist der Einsatz von Acariziden. Dabei handelt es sich um Sprays oder Granulate, die Diazinon, Chlorpyrifos oder das synthetische Pyrethroid Cyfluthrin enthalten.

### **3. Management der Wildtierpopulationen:**

Da Wild (Rehe, Hirsche, etc.) und andere Säugetiere als Zwischenwirte von Zecken dienen, könnte in Endemiegebieten eine Reduktion dieser Tiere sinnvoll sein.

#### **4. Landschaftsmanagement:**

Um Zeckenpopulationen zu reduzieren, können Landschaften so verändert werden, daß sie entweder für Zecken selbst keinen Lebensraum mehr bieten, oder für die Zwischenwirte ungeeignet werden.

Es sollte z. B. bei der Neuanlage von Parkanlagen darauf geachtet werden, daß möglichst wenig Unterholz mit Laubschichten, die einen geeigneten Lebensraum für Zecken bieten, entstehen können.

#### **5. Früherkennung und Frühbehandlung:**

Wenn die Borrelieninfektion früh erkannt wird, hat man mit der Antibiotikagabe eine gute und wirksame Behandlungsmöglichkeit. Als klinisch eindeutige Primärmanifestation entwickelt sich bei einem Großteil der Patienten das erwähnte Erythema chronicum migrans, welches die Diagnose eindeutig macht.

#### **I.4.1. Impfstoffentwicklung**

Neben den genannten Präventionsmöglichkeiten arbeitet man an der Entwicklung eines Impfstoffes gegen die Borrelienerkrankung in Europa.

Anders als in den USA, wo die Borreliose allein durch *Borrelia burgdorferi sensu stricto* verursacht wird, muß in Europa ein Impfstoff gegen verschiedene Borrelienspezies (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* und *B. afzelii*) entwickelt werden.

Der in den USA entwickelte Impfstoff besteht aus rekombinantem monovalenten Lipoprotein OspA (Outer surface protein A), einem Oberflächenantigen von *B. burgdorferi*.

In klinischen Studien wurde nach dreimaliger Impfstoffapplikation (nach 0, 1 und 6 Monaten) ein wirksamer Impfschutz erzielt. Es wurde herausgefunden,

daß der menschliche Organismus vor einer Infektion geschützt wird, indem der Impfstoff die Spirochäten mit Hilfe der gebildeten Antikörper aus den Vektoren eliminiert. Dies beruht darauf, daß Spirochäten OspA nur exprimieren, wenn sie sich in Zecken befinden. OspA wird nicht exprimiert, wenn sich die Spirochäten im menschlichen Blutkreislauf befinden. Es besteht somit ein sicherer Schutz vor einer Infektion mit Borrelien, aber eine bestehende Erkrankung kann durch eine Impfung nicht geheilt werden (Simon, 1999, S. 690-695).

In Europa ist dieser Impfstoff nicht wirksam, weil die erwähnten unterschiedlichen Borreliensubspezies verschiedene Antigenstrukturen besitzen, gegen die Antikörper gebildet werden müßten.

Zur Zeit wird in Finnland die Wirksamkeit eines polyvalenten Impfstoffs gegen das OspC- Antigen in klinischen Studien getestet (Wahlberg, 1999, S. 233-235).

Außerdem wird untersucht, ob sich eine bestimmte Antigenstruktur, die Dekorin- bindenden Proteine, als Impfstoff gegen die unterschiedlichen Borreliensubspezies eignet.

## **I.5. Diagnose der Borrelieninfektion**

### **Nachweis der Borrelieninfektion:**

Obwohl Experten sich schon lange mit einer Standardisierung des serologischen Nachweises von *Borrelia burgdorferi* beschäftigen, ist es noch nicht gelungen, ein allgemeingültiges Standardverfahren zu etablieren.

Die WHO- Expertenrunde, die 1993 in Piestany/ Slowakei zusammentrat, konnte bezüglich einer Leitlinie zum Borreliosennachweis lediglich feststellen:

„Diagnostische Methoden zur Erkennung von Borreliose sollten auf dem höchstmöglichen Grad der Sensitivität und Spezifität standardisiert werden.“  
(Talaska 1998 c, S. 55)

### **Prinzipiell kann die Infektion nachgewiesen werden:**

- 1.: durch direkten Nachweis von lebenden Erregern, ihrer DNA oder spezifischer Antigene
- 2.: durch Nachweis der Immunantwort des Organismus gegen *B. burgdorferi*

### **Zu 1.: Erregernachweis**

#### **A: Direkter Erregernachweis:**

Borrelien können mittels verschiedener Färbungen dargestellt werden. Die einfachsten Verfahren sind die verlängerte Giemsa-Färbung (Fixation des Präparats mit Methylalkohol; Übergießen mit Azur-Eosin-Lösung) und die Silberfärbung.

Neuere Entwicklungen sind die immunologischen Färbetechniken mit spezifischen Antikörpern zum Nachweis der Erreger.

Der kulturelle Nachweis der Borrelien gelingt durch Anzucht in einem speziellen Medium aus Nährbouillon mit NaCl und Peptonen. Als Untersuchungsmaterial dienen bei diesen Methoden Hautbiopsate, Liquor, Gelenkpunktate, Augenkammerwasser oder Herzmuskelbiopsate. Bei den Hautbiopsaten ist die Sensitivität mit 45% am größten, so daß bei der Diagnose Erythema chronicum migrans und Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer in etwa der Hälfte der Fälle mit einem positiven Befund gerechnet werden kann. Die Anzucht aus den anderen Materialien gelingt nur mit einer Häufigkeit von ca. 10%, so daß der kulturelle Nachweis wegen der geringen

Sensitivität und dem hohen Zeitaufwand für die Routinediagnostik nicht geeignet ist (Talaska, 1998 d, S. 48).

### **B: PCR: Polymerase- Chain- Reaction:**

Mit der PCR hat man eine Methode entwickelt, mit der man DNA in Urin, Liquor, Gelenkflüssigkeit und Hautbiopsaten nachweisen kann.

Durch die DNA- Polymerase und kurze DNA- Startstücke, die sogenannten Primer, können spezifische Teilabschnitte vermehrt werden (z.B. OspA- Gen, Flagellin- Gen, 16s- rRNA- Gen). Bei bestimmter Primer- Auswahl kann Geno- und Serotyp des einzelnen Erregers bestimmt werden.

Für den Borrelien- DNA- Nachweis wird in der Regel die Zwei- Phasen- PCR durchgeführt. Zielgene können z.B. das OspA- Gen sein oder bestimmte Abschnitte auf dem Flagellin- Gen u.a.. Die Sensitivität der PCR ist unzureichend, d.h. es werden immer noch zu viele kranke Personen als gesund eingestuft. Einige Untersuchungen aus dem Jahr 1997 belegen dies eindrucksvoll:

Bamborschke und Herpel (Bamborschke und Herpel, 1997, Abstract) fanden bei Patienten mit klinisch typischer Neuroborreliose nur in 3,31% positive Liquorbefunde. Karsten et al. (Karsten et al., 1997, Abstract) konnten bei Kindern mit Neuroborreliose immerhin in 19,1% der Fälle einen positiven Liquorbefund mittels PCR feststellen. Wesentlich höher mit 63,6% war die Sensitivität beim Nachweis der B.burgdorferi- DNA aus Gelenkpunktat bei Patienten mit Lyme- Arthritis.

Unter experimentellen Bedingungen sind die Ergebnisse der PCR- Diagnostik bezüglich der Borrelien- DNA wesentlich besser. Es können Keimzahlen von <10 Keime/ ml nachgewiesen werden. Allerdings entfallen unter Laborbedingungen die störenden Variablen wie Kontamination durch andere

Bakterien, sowie der Abbau von abgestorbener Borrelien- DNA durch DNAsen.

Ein wesentlicher Schritt zur Verbesserung der PCR- Ergebnisse wäre daher ein zuverlässiges Kühlen bzw. Einfrieren der Proben, um die Keimzahl durch Kontamination mit anderen Bakterien gering zu halten; den Proben müßte zur Konservierung Ethanol zugesetzt werden (Goodman, 1996, Plenary Session Laboratory Diagnosis).

### **C: Antigennachweis mittels Enzymimmunoassay**

Mit Hilfe eines Enzymimmunoassay konnte das *Borrelia burgdorferi*- Antigen in Urin, Liquor und Gelenkpunktat nachgewiesen werden. Positive Ergebnisse fanden sich vor allem bei frühem Erythema migrans und bei chronifizierter Borreliose. Es wurde festgestellt, daß unter Antibiotika- Therapie die Antigenausscheidung im Urin stark ansteigt und daß diese Erregereliminierung im Urin mittels des Enzymimmunoassays gut nachgewiesen werden kann (Harris, N.S. und Boyd, G.S., 1995, S. 37- 41).

Zur Zeit kann bei diesem Test noch keine Aussage über die Sensitivität und Spezifität des Antigennachweises gemacht werden, da es keine klinischen Vergleichsgruppen gibt.

### **Zu 2.: Nachweis der Immunantwort des Organismus**

Die Vorteile dieser Verfahren liegen darin, daß sie weniger aufwendig in der Durchführung und in der Regel preiswerter als der direkte Erregernachweis sind.

Ein Nachteil besteht jedoch darin, daß die einzelnen Methoden nicht standardisiert sind und eine Vergleichbarkeit unter den einzelnen Labors



schwierig ist. Diesem Problem wird durch Ringversuche begegnet, an denen die einzelnen Labors in bestimmten Zeitabständen teilnehmen.

Es ist noch nicht völlig klar, ob bei den drei unterschiedlichen humanpathogenen Spezies (*Borrelia burgdorferi sensu strictu*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*) auch ein Erreger- spezifischer Organotropismus besteht. In diesem Fall könnten bei unterschiedlichen Organmanifestationen von vornherein differenzierte Antigene zum Nachweis der Immunantwort des Körpers eingesetzt werden.

In den USA stellt sich dieses Problem nicht, da als einziger humanpathogener Erreger der Lyme- Borreliose *Borrelia burgdorferi sensu stricto* isoliert wurde.

Zur Zeit besteht die allgemeine Empfehlung, daß bei den angewandten Testverfahren eine Spezifität von 98% erreicht werden soll. Sofern die Spezifität einzelner Testverfahren geringer ist, wird eine Kombination von Tests empfohlen.

Die angewendeten Testverfahren unterscheiden sich vor allem in:

- der serologischen Technik bei den verschiedenen Testverfahren
- verschiedenen *Borellia burgdorferi*- Stämmen als Testantigen
- der Antigenpräparation
- der Vorbehandlung der Seren
- der cut- off- Definition

An Tests werden zur Zeit durchgeführt:

## **A: Fluoreszenzantikörpertest**

Für diese Untersuchung werden Borrelien auf einem Objektträger fixiert. Bei der Fixation kommt es zur Exposition von Flagellin, einem bei Borrelien vorkommendem Antigen.

Flagellin- Antikörper aus Patientenserum binden an Borrelien; als zweiter Antikörper wird ein fluoreszenzfarbstoffmarkierter Anti- Humanantikörper eingesetzt; somit sind die Borrelien im Fluoreszenz- Mikroskop sichtbar. Dieser Test kann als IgM- bzw. IgG- Screening- Test eingesetzt werden, der bei positivem oder fraglich positivem Ergebnis mit einem Westernblot kombiniert wird; es muß nicht auf die unterschiedlichen Borrelien- Genotypen geachtet werden, da daß Flagellin- Antigen bei allen drei Untergruppen (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*) gleich ist. Die Bewertung in den einzelnen Labors (positiv/ negativ) ist nicht einheitlich, da es sich um subjektive Auswertungen des jeweiligen Untersuchers handelt.

Zur Objektivierung dieses Problems wird zur Zeit auf nationaler Ebene durch die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, auf europäischer Ebene durch eine EU- unterstützte Gruppe und weltweit durch die WHO versucht, eine Standardisierung in der Diagnostik der Borreliosen zu erarbeiten (Tilton, R.C. und Ryan, R.W., 1993, S. 208-214).

## **B: Enzymimmunoassay**

Mit dem Enzymimmunoassay werden IgG- oder IgM- Antikörper nachgewiesen.

Der Test beruht auf einer Enzym- Substrat- Reaktion und detektiert spezifisch gebundene Antikörper aus dem Serum. Dabei kommt es beim Nachweis von Antikörpern zu einer Farbänderung im Serum, die mit der Konzentration der Antikörper korreliert und mit Hilfe von chargenspezifischen Farbtabelle auswertet wird.

Mittlerweile gibt es ein breites Spektrum von Enzymimmunoassays für die Borreliendiagnostik. Es gibt Tests mit Sonikat- Vollantigen (verhindert falsch-positive Ergebnisse durch Treponemen), mit Anreicherung einzelner Antigene, aufgereinigte Flagellin- Tests und auch Tests mit rekombinanten Antigenen oder Peptiden (Einsatz von definierten Proteinen, damit eine Verwechslung mit anderen Antigenen nicht möglich ist).

Die Probleme der IgM- Diagnostik bestehen darin, daß es durch die Reaktion mit Rheumafaktoren zu falsch- positiven Ergebnissen kommen kann.

Deshalb sollten die Seren mit Rheumafaktor- Absorbens oder  $\mu$ -Capture- Test vorbehandelt werden, um rheumaspezifische Antikörper herauszufiltern.

IgM- Antikörper können auch bei frischen oder reaktivierten Epstein- Barr- Virus- Infektionen nachgewiesen werden; es wird eine polyklonale Aktivierung vermutet.

Des Weiteren erhält man falsch positive Ergebnisse bei kreuzreaktiven Antikörpern:

humanpathogene Spirochäten wie Treponemen, Rückfallfieber- Borrelien (*B. recurrentis*), Heat- shock- Proteine p60/ p75 reagieren mit Antikörpern gegen nicht verwandte Bakterien.

Falsch negative Ergebnisse können durch kompetitive Hemmung bei gleichzeitig vorhandenen hohen Borrelien- spezifischen IgG- Antikörpern auftreten.

### **C: Agglutinationstest**

Beim indirekten Hämagglutinationstest (IHA) werden durch spezifische Antikörper, die sich im Serum befinden, Antigen- beladene Mikropartikel agglutiniert.

Da die Sensitivität und Spezifität nicht einheitlich bewertbar ist, wird der IHA gelegentlich als Screening- Test verwendet.

## **D: Blotverfahren**

Die Blotverfahren stehen als Westernblot und als Dotblot- Verfahren zur Verfügung, wobei sich für die Routine der Westernblot durchgesetzt hat. Häufig wird der Westernblot im Anschluß an einen positiven oder fraglich positiven Immunfluoreszenztest durchgeführt, der sich als Screeningtest etabliert hat. Beim Einsatz von Blot- Verfahren ist es wichtig, daß die Protein-Expression der Bakterienstämme überwacht wird, da manche Subkulturen einzelne Proteine zum Teil nicht mehr exprimieren und diese dann bei der diagnostischen Bewertung entfallen. Die Borrelien- Proteine werden mit Hilfe von Membranen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine werden auf Nitrozellulose übertragen und mit den Antikörpern aus dem Patientenserum zur Reaktion gebracht. Die Reaktionen werden mit einem Human- Antikörper sichtbar gemacht. Dieser zweite Antikörper kann radioaktiv oder durch ein Enzym markiert sein.

Prinzipiell ist es möglich, unterschiedliche Genospezies, rekombinante Antigene und Antigenpräparationen zu benutzen. Es ist damit der Nachweis von IgG, IgM und IgA möglich. Der Nachweis von IgA hat jedoch für die Routinediagnostik keinen Vorteil erkennen lassen.

Je nach Hersteller werden zur Auswertung des Westernblots unterschiedliche Proteine herangezogen: für IgG das OspA/ OspB und OspD- Protein (speziesspezifische Proteine, die sich hinsichtlich ihres Gewichts, das in Kilodalton -kD- angegeben wird, unterscheiden); außerdem Flagellin und ein hochmolekulares Protein wie das 83-/ 88- oder 100- kD- Protein. Die dominanten Antigene für IgM sind das OspC, wiederum Flagellin und die p39- Bande.

Im Frühstadium der humoralen Immunantwort erkennen die Antikörper nur ein kleines Spektrum der Borrelienantigene; mit zunehmender

Erkrankungsdauer wächst dieses Spektrum jedoch und es werden teilweise mehr als 20 Banden dargestellt.

Ein generelles Problem tritt beim Einsatz des Westernblot- Verfahrens auf: wegen der unterschiedlichen *Borrelia burgdorferi*- Genotypen müßten eigentlich Antigene mehrerer Borrelienstämme gleichzeitig eingesetzt werden. Dies bedeutet für die Praxis, daß auf den Teststreifen zusätzliche Banden auftreten, die noch schlechter zu trennen sind. Eine mögliche Lösung dieses Problems besteht im Einsatz von rekombinanten Antigenen; hierbei werden nur definierte Proteine eingesetzt.

Bisher gibt es für Europa noch kein einheitliches und standardisiertes Diagnose- bzw. Auswertungsverfahren für die Borrelien- Blot- Diagnostik. Zum Teil wurden die für die USA erstellten Richtlinien des CDC (Center of Disease Control) für Deutschland übernommen. Diese Richtlinien sind aber nur schlecht übertragbar, weil in Deutschland drei verschiedene humanpathogene Borrelien- Spezies auftreten und nicht wie in den USA lediglich *Borrelia burgdorferi sensu stricto*.

In einer Ende 1997 veröffentlichten Studie hat man neue Interpretationskriterien für die Blot- Diagnostik in Europa vorgeschlagen. Dazu hat man die Seren europäischer Patienten mit Borrelienerkrankung unter Verwendung von Immunoblots mit verschiedenen Stämmen von *Borrelia burgdorferi* untersucht und ist zu den nachfolgenden Ergebnissen gekommen:

## Definitionskriterien für einen positiven Westernblot:

Die in der nachfolgenden Tabelle dargestellten Kriterien sind unter Verwendung der genannten Stämme erarbeitet worden. Derzeit ist nicht sicher, ob diese Daten auch auf andere Stämme der jeweiligen Spezies übertragen werden können, da die Expression der Proteine in verschiedenen Stämmen unterschiedlich sein kann.

<i>Spezies</i>	<i>IgM- Antikörper</i>	<i>IgG- Antikörper</i>
Borrelia burgdorferi sensu stricto (Stamm Pka2)	> 1 der folgenden Banden: p41 <sup>1,2</sup> , p39, OspC, 18kD, 17,3 kD	> 1 der folgenden Banden: p93 <sup>3</sup> , 58kD, 56 kD, OspC, 21 kD <sup>4</sup> , 18 kD, 17,3 kD
Borrelia garinii (Stamm Pbi)	> 1 der folgenden Banden: p41, p39, OspC	> 1 der folgenden Banden: p93, p39, OspC, 21 kD, 17 kD
Borrelia afzelii (Stamm Pko)	> 1 der folgenden Banden: p41, p39, OspC, p17	> 2 der folgenden Banden: p39, 58 kD, 43 kD, p39, p30, OspC, 21 kD, 17 kD, 14 kD

**Tabelle 4:** Kamradt, 1998, S. 217

<sup>1</sup> Proteine, deren kodierende Gensequenz bekannt ist, werden mit der allgemein üblichen Bezeichnung (z.B. OspC) oder dem Präfix „p“ vor dem Molekulargewicht in Kilodalton (kD) (z.B. p41) bezeichnet.

Für Proteine, die noch nicht charakterisiert sind, wird nur das Molekulargewicht (z.B. 18 kD) angegeben.

<sup>2</sup> Für das p41 (Flagellin) werden häufig Kreuzreaktionen beobachtet. Daher zählt eine 41 kD- Bande nur dann als positiv, wenn sie mindestens so stark ausgeprägt ist, wie die 41 kD- Bande in einem stark positiven Kontrollserum.

<sup>3</sup> Auch als p83/ 100 bezeichnet

<sup>4</sup> Nicht zu verwechseln mit dem etwa in gleicher Höhe laufenden OspC.

## **I.6. Empfehlungen der WHO (World Health Organisation) und des CDC (Center of Disease Control) zur Verbesserung der Diagnose bei Borrelieninfektion (WHO, 1995, S.141):**

Für die Diagnostik der Borreliose gibt es von der WHO folgende Empfehlungen:

- 1.) Ein Minimum der Spezifität der serologischen Tests von 98% ist erforderlich. Wenn dies nicht mit einem Test gewährleistet werden kann, sollten Testkombinationen eingesetzt werden. Es werden keine bestimmten Testmethoden besonders empfohlen.
- 2.) Der cut- off eines serologischen Tests für die Borreliose- Diagnostik sollte an Hand eines Samples von 100 gesunden Erwachsenen für eine Region individuell eingestellt werden, um der unterschiedlichen Prävalenz in unterschiedlichen Territorien Rechnung zu tragen.
- 3.) Bei Einsatz von quantitativen Tests sollte der cut- off mit einer nicht parametrischen Methode (z.B. 98- Perzentile) eingestellt werden.
- 4.) Zur externen Qualitätssicherung sollten alle Laboratorien an den entsprechenden Ringversuchen teilnehmen. Die Ringversuche sollten 6- 12 Seren, ungepooled und nicht verdünnt umfassen, zusätzlich Angaben zur Klinik und Anamnese. Alle Ergebnisse müssen mit dem klinischen Hintergrund bewertet werden.
- 5.) Neu einzuführende Testverfahren müssen vor Zulassung nachvollziehbar in Sensitivität und Spezifität mindestens den gegenwärtig verfügbaren Methoden gleichwertig oder besser sein. In jedem Testkit muß der Hinweis enthalten sein, daß eine Interpretation nur im klinischen Kontext möglich ist.

In Deutschland gelten zur Zeit folgende Empfehlungen zur Borrelieninfektion, die vom Land Brandenburg in Anlehnung an die Empfehlungen des CDC aufgestellt wurden (Dr. F. Dressler, 1998 und Dr. K. Stöhr, 1998):

- 1.) Jeder klinische Fall einer Borreliose, auch ein Erythema migrans, ist eine antibiotisch zu behandelnde Erkrankung.
- 2.) Die serologische Diagnostik der Borreliose sollte sich auf Grund der Heterogenität der Erreger und einer noch unzureichenden Sensitivität und Spezifität der Tests zur Zeit primär auf eine Kombination von IgG- und IgM-Enzymimmunoassay oder Fluoreszenzantikörpertest und IgG- und IgM-Westernblot stützen.
- 3.) Validierte Bewertungskriterien für den Westernblot sind zur Zeit für Europa nicht verfügbar. Vorläufig wird empfohlen, die CDC- Empfehlungen als Richtlinie für die Bewertung der Vollantigen- Westernblots anzuwenden.
- 4.) Ein typisches Erythema migrans ist eine klinische Diagnose, die nicht zwingend Anlaß für eine Serodiagnostik sein sollte.
- 5.) Weiterführende Diagnostik ist nur in Rücksprache mit dem behandelnden Arzt einzuleiten. Wenn bei klinischem Verdacht auf spät disseminierte Borreliose bzw. beim Post- Lyme- Syndrom die empfohlene Basisdiagnostik keine Klärung bringt, sollte man im Interesse des Patienten, der unter einem immensen Leidensdruck und einer schweren Beeinträchtigung seiner Lebensqualität stehen kann, mit dem maximalen diagnostischen Spektrum herangehen, um weitestgehend eine therapiebedürftige Erkrankung von einer Lyme- Phobie abzugrenzen.
- 6.) Eine Lues- Serologie (TPHA) zum Ausschluß nicht Borrelia- burgdorferi- spezifischer Reaktionen sollte nur in den Fällen durchgeführt werden, die mit dem empfohlenen Testschema nicht geklärt werden können.
- 7.) Kein Borrelien- Befund darf ohne Interpretation durch den Laborarzt / Arzt für Mikrobiologie freigegeben werden.



8.) Eine sinnvolle Befundinterpretation ist nur in enger Zusammenarbeit mit dem behandelnden Arzt möglich. Ohne Angabe zur klinischen Symptomatik ist eine Wertung des Befundes im Sinne der Erkrankung der Lyme- Borreliose nicht möglich.

9.) Laborbefunde müssen in Zukunft zwischen den Laboratorien vergleichbar werden bzw. sollten die sich aus den Befundkonstellationen ergebenden Interpretationen zu gleichen Schlußfolgerungen bezüglich des Infektionsstatus führen. Der Aufbau eines Serumpanels von klinisch definierten Borreliosen ist dafür dringend erforderlich.

## **II. Ziel und Fragestellung der Studie**

Wie bereits beschrieben, ergeben sich bei der Diagnosestellung einer Borrelieninfektion Probleme. Dies ist zum einen auf eine mangelnde Sensitivität und Spezifität der serologischen Testverfahren zurückzuführen und zum anderen auf eine mangelnde Standardisierung bei der Anwendung der Testverfahren.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, die Sensitivität und Spezifität der verwendeten Testverfahren Immunfluoreszenztest und Westernblot für IgG und IgM darzustellen.

Es soll analysiert werden, ob der Immunfluoreszenztest die Aufgaben eines Screening- Verfahrens erfüllt.

Bei der Auswertung des Westernblots wird die binär logistische Regression durchgeführt. Dabei werden die Personen berücksichtigt, die definitiv, d.h. gemäß klinischer Diagnose erkrankt sind. Mit diesem Analyseverfahren kann die Art des Zusammenhangs zwischen testpositiven Personen und dem jeweiligen Krankheitsstadium dargestellt werden.

Des Weiteren soll dargestellt werden, ob es zwischen der Erkrankung an Morphea und einer Borrelieninfektion eine Korrelation gibt. Da es sich bei dieser Auswertung nicht um eine Fall- Kontroll- Studie handelt (es ist keine gesunde Kontrollgruppe vorhanden), wird lediglich der Anteil der Patienten mit positivem Testergebnis, welche gleichzeitig die klinische Diagnose Morphea haben, dargestellt.

Außerdem werden die erfaßten Daten nach Häufigkeit des Auftretens männlicher und weiblicher Patienten in den verschiedenen Krankheitsstadien, sowie nach der Altersverteilung in den jeweiligen Stadien dargestellt.

### **III. Methodik**

#### **III.1. Datenerhebung**

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine retrospektive Studie, deren Grundlage die Auswertung von Patientenakten aus der Dermatologischen Klinik der Philipps- Universität Marburg ist.

Bei den erhobenen Daten handelt es sich um bereits vorhandene Daten aus Patientenakten. Die anamnestischen Daten, die klinischen Untersuchungen und die serologischen Testverfahren wurden ausschließlich zur Sicherung der Arbeitsdiagnose Borrelienerkrankung durchgeführt. Für die Patienten entstand keinerlei zusätzliche Belastung.

Die Auswertung der Akten beschränkt sich auf den Zeitraum zwischen 1994 und 1998.

Für jeden Patient wurden folgende Daten erhoben:

Alter, Geschlecht, klinisches Stadium der Borrelieninfektion, Ergebnisse von serologischen Verfahren, d.h. Immunfluoreszenztest und Westernblot, Ergebnis des TPHA- Tests und des Tests auf Rheumafaktoren.

Um eine Aussage über die statistischen Zusammenhänge zwischen dem jeweiligen Erkrankungsstadium der Borreliose und den festgestellten Testergebnissen zu machen, werden die Daten mit Hilfe der binär logistischen Regression analysiert.

Allgemein dient die Regressionsanalyse dazu, die Art des Zusammenhangs zwischen abhängiger und unabhängiger Variable zu ermitteln, d.h. man kann den Wert einer abhängigen Variablen aus den Werten unabhängiger Variablen vorhersagen.

Die binär logistische Regression prüft die Abhängigkeit einer dichotomen Variablen von anderen Variablen beliebiger Skalierung. Dabei handelt es sich bei der dichotomen Variablen normalerweise um ein Ereignis, das eintreten

kann oder nicht. Mit Hilfe der binär logistischen Regression wird die Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines Ereignisses in Abhängigkeit von den Werten der unabhängigen Variablen berechnet.

Die Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines bestimmten Ereignisses wird nach folgender Formel berechnet:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-z}}$$

Dabei steht z für:  $z = b_1 \times x_1 + b_2 \times x_2 + \dots + b_n \times x_n + a$

$b_i$  sind die Regressionskoeffizienten, die mit Hilfe der binär logistischen Regression berechnet werden.  $x_i$  sind die jeweiligen Werte der unabhängigen Variablen und  $a$  ist eine Konstante.

Ergibt sich für das so berechnete  $p$  ein Wert, der kleiner als 0,5 ist, so geht man davon aus, daß das Ereignis nicht eintritt. Im anderen Fall nimmt man das Eintreffen des Ereignisses an.

Überträgt man diese allgemeine Beschreibung auf die Daten aus den Patientenakten, so ergibt sich:

Abhängige, dichotome Variable ist der Westernblot, der als mögliches Ergebnis entweder positiv oder negativ ist.

Unabhängige Variablen sind in diesem Fall die Krankheitsstadien 1- 3 der Borreliose.

Mit Hilfe der binär logistischen Regression kann nun eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines positiven Testergebnisses im Westernblot in Abhängigkeit vom jeweiligen Krankheitsstadium gemacht werden.

Nicht eingeschlossen wurde in das Analyseverfahren das Krankheitsstadium 0, da es sich bei diesem um Patienten ohne klinische Diagnose einer Borreliose

handelt; um wirklich sicher zu gehen, daß keine Borrelieninfektion vorliegt, wird als Ausschlußverfahren ein Westernblot durchgeführt.

Zusätzlich wurden Patienten aus der binär logistischen Regression ausgeschlossen, die durch einen positiven TPHA- Test (Luesserologie) oder einen positiven RF-Test (Rheumafaktornachweis) ein falsch positives Testergebnis hatten (Variable „Filter“ in der binär logistischen Regression).

### **III.1.1. Datenschutz**

Die aus den Patientenakten erhobenen Daten Alter, Geschlecht, Stadium der Borrelieninfektion, Ergebnisse von IFT und WB, Ergebnis von TPHA- und RF-Test werden geschützt. Die Datenerhebung erfolgt ohne Aufnahme des Namen des jeweiligen Patienten. Damit dennoch nachvollzogen werden kann, welche Daten zu einem bestimmten Patienten gehören, wird jedem Patienten eine fortlaufende Zahl zugeordnet. Diese Numerierung wird aber nur studienintern verwendet, so daß die Patienten auf jeden Fall anonym bleiben.

## **III.2. Patientenkollektiv**

### **III.2.1. Ein- und Ausschlußkriterien des zu untersuchenden**

#### **Patientenkollektivs:**

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten, die im Zeitraum zwischen 1994 und 1998 in der dermatologischen Ambulanz vorstellig wurden oder stationär aufgenommen wurden und bei denen eine serologische Untersuchung auf Borrelieninfektion durchgeführt wurde.

Die in die Studie aufgenommenen Patienten müssen eines der folgenden Einschlußkriterien erfüllen:

- 1.) Die Patienten haben einen klinisch begründeten Verdacht auf eine Borrelien- Infektion.
- 2.) Die Patienten haben einen anamnestisch begründeten Verdacht auf eine Borrelien- Infektion.
- 3.) Die Patienten haben bereits eine serologisch gesicherte Borrelieninfektion, und es wird eine Verlaufskontrolle durchgeführt
- 4.) Die Patienten haben einen klinischen Verdacht auf eine Borrelieninfektion aber eine negative Borrelienserologie, und es wird eine Verlaufskontrolle durchgeführt.

Ausgeschlossen wurden diejenigen Patienten, die nicht im vorgegebenen Beobachtungszeitraum in der dermatologischen Klinik behandelt wurden, und Patienten, bei denen keines der serologischen Verfahren Immunfluoreszenztest oder Westernblot angewendet wurde.

Besonderheiten:

Patienten, die sich nach dem klinischen Bild keinem der definierten Stadien der Borrelieninfektion zuordnen ließen bzw. bei denen möglicherweise eine andere Erkrankung vorlag wurden unter der Kategorie „Sonstige“ (Stadium „0“) subsumiert.

### **III.2.2. Stichprobenumfang und Zielvariable**

Es handelt sich um ein Patientenkollektiv von 201 Personen, bei denen insgesamt 314 Untersuchungen zur Borrelienserologie durchgeführt wurden, davon bei 63 Patienten Wiederholungsuntersuchungen, d.h. Verlaufskontrollen.

Bei den Patienten mit Verdacht auf eine Borrelieninfektion wurde als Screening- Verfahren ein Immunfluoreszenztest durchgeführt, der bei positivem oder grenzwertigem Ergebnis durch einen Westernblot ergänzt wurde.

Zielvariable ist die Erfassung des Ergebnisses des Westernblots (positiv/negativ) in Abhängigkeit vom jeweiligen Krankheitsstadium.

### **III.3. Untersuchungstechnik**

Wie bereits erwähnt, werden zur serologischen Untersuchung auf Borrelieninfektion die Testverfahren Immunfluoreszenztest und Westernblot eingesetzt. Dazu wird das Patientenserum auf IgG- und IgM- Antikörper untersucht. Die Laboruntersuchungen werden im klinischen Labor der Hautklinik durchgeführt.

#### **III.3.1. Technische Geräte und Material**

Bei dem indirekten Immunfluoreszenztest handelt es sich um ein Produkt der Firma „viramed“ (Borrelia burgdorferi IgG - bzw. IgM- IFT), das zum Nachweis von IgG- bzw. IgM- Antikörpern gegen Borrelia burgdorferi geeignet ist.

Zur Durchführung der Tests werden folgende Materialien und Hilfsmittel benötigt:

- *Borrelia burgdorferi* Antigen- Objektträger, zehn Felder, beschichtet mit *Borrelia burgdorferi*, Stamm B31
- *Borrelia* IgG- bzw. IgM- positive Kontrolle, human, lyophilisiert (Lyme-positive- Control)
- *Borrelia* IgG- und IgM- negative Kontrolle, human, lyophilisiert (Lyme-negative- Control)
- Konjugat, Antihumanglobulin von der Ziege, gebrauchsfertig: IgG-spezifisch für den IgG- Kit und IgM- spezifisch für den IgM- Kit
- PBS- Puffersalz, pH 7,5
- Eindeckmedium, Glycerol
- Deckgläschen
- Blotter
- Marsorb G, Anti- IgG- Absorbens, gebrauchsfertig
- Separat erhältlich: FTA- ABS- Sorbens zur Entfernung von Reiterreponemen für *B. burgdorferi* IFT, gebrauchsfertig

Im Anschluß an einen positiven oder grenzwertigen IFT wird ein Westernblot der Firma „viramed“ zum Nachweis von IgG - bzw. IgM- spezifischen Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* durchgeführt. Dazu werden folgende Materialien bzw. technische Hilfsmittel benötigt:

1. Antigen- Streifen, Nitrozellulose- Streifen, an denen Antigene von *B. burgdorferi* gebunden sind, elektrophoretisch aufgetrennt in einzelne Banden, gebrauchsfertig, numeriert, Isolat vom Stamm B31. Der Streifen für die Cut- off- Kontrolle ist mit einem „C“ gekennzeichnet.
2. *B. Burgdorferi* IgG-, IgM- positive Kontrolle, human, flüssig,



Konzentrat B. burgdorferi IgG-, IgM- Cut- off- Kontrolle, human, flüssig, Konzentrat

3. B. burgdorferi negative Kontrolle, human, flüssig, Konzentrat

4. Antihumanglobulin- Konjugat, Ziege, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, 10- fach- Konzentrat, flüssig

5. Proben-/ Waschpuffer

6. Proben-/ Waschpuffersalz

7. Chromogen-/ Substratlösung, gebrauchsfertig

### **III.3.2. Untersuchungsablauf**

Für die Durchführung des Immunfluoreszenztest ergibt sich folgende Vorgehensweise:

Zuerst müssen die Reagenzien vorbereitet werden. Sie müssen auf Raumtemperatur gebracht werden (20-25°C) und die lyophilisierten Reagenzien müssen mindestens 15 Minuten vor Gebrauch rekonstituiert werden. Sie sind deshalb vorsichtig zu mischen, eine Schaumbildung ist zu vermeiden.

Die Objektträger sind bereits gebrauchsfertig, die Kontrollen müssen mit PBS- Puffer verdünnt werden:

- Negative Kontrolle: 1:100 in PBS- Puffer
- IgG- positive Kontrolle: 1:10 in PBS- Puffer
- IgM- positive Kontrolle: 1:10 in PBS- Puffer

Die Konjugate sind gebrauchsfertig, das Puffersalz des PBS- Puffer wird mit 1l Aqua dest. verdünnt. Um die Cut- off-, d.h. Grenzwert- Kontrolle herzustellen, sollten die Kontrollen bis zu der auf dem Kit- Etikett angegebenen Titerstufe (+/- eine Titerstufe) verdünnt werden.

Auch die Patientenproben, also die Seren der Patienten, müssen vor Durchführung des Tests vorbereitet werden.

Um falsch positive Ergebnisse durch Kreuzreaktionen mit Treponemen zu vermeiden, müssen die Patientenproben sowohl für IgG als auch für IgM mit FTA- ABS Sorbens zur Entfernung von Reitertreponemen vorbehandelt werden. Für die IgM- Bestimmung ist es notwendig, die Patientenproben mit Anti- IgG- Absorbens (Marsorb G) vorzubehandeln, um falsch negative Ergebnisse durch hohe Borrelien IgG- Antikörper sowie falsch positive Ergebnisse durch Rheumafaktor (IgM) zu vermeiden. Die Kontrollen werden nicht vorbehandelt.

Die Arbeitsschritte zur Durchführung des IFT- Tests sind folgende:

- Die Objektträger müssen ausgepackt werden und es ist zu beachten, daß bei jedem Ansatz eine positive, eine negative und eine Puffer- und Konjugat- Kontrolle mitlaufen muß.
- Von den mit FTA- ABS- Sorbens (zur Entfernung von Reitertreponemen) vorbehandelten Patientenproben und von den verdünnten Kontrollen werden ca. 15µl auf die entsprechenden Reaktionsfelder getropft.
- Die Objektträger werden für ca. 30 Minuten in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubiert.
- Danach wird der Objektträger mit PBS- Puffer abgespült, danach zweimal für jeweils fünf Minuten in PBS- Puffer gewaschen und anschließend getrocknet.
- Auf jedes Reaktionsfeld wird ein Tropfen Konjugat aufgetragen.
- Der Objektträger wird ca. 30 Minuten in einer Feuchtkammer bei 37°C im Dunkeln inkubiert.
- Der Objektträger wird erneut gespült, gewaschen und getrocknet.

- Nun wird der Objektträger mit Glycerol und einem Deckglas abgedeckt und kann unter dem Mikroskop bei 400- facher Vergrößerung ausgewertet werden.

Zur Durchführung des Westernblots müssen die Reagenzien vorbereitet werden:

Zuerst müssen die Reagenzien auf Raumtemperatur (20- 25°C) erwärmt werden.

Das Proben-/ Waschpuffer- Konzentrat muß 1:10 in Aqua dest. verdünnt werden.

Danach wird das Proben-/ Waschpuffersalz komplett zugegeben und gut gemischt. Das Konjugat wird 1:10 mit der Proben-/ Waschpuffer- Verdünnung verdünnt. Die Kontrollen werden unverdünnt eingesetzt. Dabei wird pro Ansatz 80µl Kontrollserum verwendet.

Pro Ansatz werden jeweils 20 µl Patientenserum unverdünnt eingesetzt.

Wenn die benötigten Reagenzien entsprechend den Vorschriften vorbereitet wurden, kann der Westernblot durchgeführt werden. Dabei sind die folgenden Arbeitsschritte notwendig:

- Die Inkubationswannen werden mit Proben-/ Waschpuffer gespült, der Puffer wird danach abgegossen.
- Je ein Antigenstreifen wird in jede Rinne gegeben.
- Die Streifen werden mit je 2 ml Proben- / Waschpuffer benetzt und fünf Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert.
- Das Patientenserum wird direkt auf die Antigenstreifen pipettiert.
- Die Antigenstreifen werden 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert.
- Die Flüssigkeit wird abgegossen.
- Nun werden die Antigenstreifen drei mal je fünf Minuten gewaschen, wobei jeweils zwei ml Waschpuffer hinzugegeben

- werden, der dann nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten wieder abgegossen wird.
- Die Antigenstreifen werden vollständig mit Konjugat- Verdünnung bedeckt.
  - Es folgt eine Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur.
  - Das Konjugat wird wieder abgegossen.
  - Das Konjugat wird genauso wie oben beschrieben drei mal fünf Minuten abgewaschen.
  - Es werden je zwei ml Aqua dest. zugegeben.
  - Die Antigenstreifen werden eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert.
  - Die Flüssigkeit wird wieder abgegossen.
  - Es werden je zwei ml Chromogen-/ Substratlösung hinzupipettiert.
  - Nun wird solange inkubiert, bis die Cut- off- Bande auf dem Cut- off- Kontrollstreifen zu sehen ist. Die Cut- off- Bande für IgG ist die 41 kD- Bande, für IgM die 25 kD- Bande. Die Entwicklung dauert für IgG ca. acht bis zwölf Minuten und für IgM ca. zehn bis fünfzehn Minuten.
  - Nach dem Erscheinen der Cut- off- Bande wird die Entwicklung gestoppt, indem die Flüssigkeit abgegossen wird.
  - Ohne Zwischeninkubation wird dann drei mal mit jeweils zwei ml Aqua dest. gespült.
  - Zum Schluß werden die Streifen getrocknet und ausgewertet.

### III.3.3. Auswertung der verwendeten Testverfahren IFT und WB

Für die Auswertung der behandelten Patientenseren im Immunfluoreszenztest gilt:

Das Ergebnis ist positiv, wenn deutlich apfelgrün fluoreszierende Borrelien erkennbar sind.

Das Ergebnis ist negativ, wenn nur ein dunkler, schwarz- grüner Untergrund zu sehen ist.

<b><i>IgG- Titer</i></b>	<b><i>Bedeutung</i></b>	
< 1:160	negativ	Keine Antikörper gegen B. burgdorferi nachweisbar
≥ 1: 160	positiv	Antikörper gegen B. burgdorferi nachweisbar, Hinweis auf Borreliose
<b><i>IgM- Titer</i></b>	<b><i>Bedeutung</i></b>	
< 1:80	negativ	Keine Antikörper gegen B. burgdorferi nachweisbar
≥ 1:80	positiv	Antikörper gegen B. burgdorferi vorhanden, Hinweis auf eine frische Borreliose.

**Tabelle 5:** Beurteilung von IgG- und IgM- Titer

Für die Titerbeurteilung mit FTA- ABS Sorbens behandelte Seren ergibt sich:

Bei der Auswertung sind folgende Hinweise zu beachten:

Da IgG- Antikörper normalerweise erst vier bis acht Wochen nach einer Borrelieninfektion gebildet werden, sollte bei Verdacht auf eine frische Infektion eine IgM- Bestimmung durchgeführt werden (IgM- Antikörper treten normalerweise ca. 1-8 Wochen nach Infektion erstmals auf und sinken dann innerhalb mehrerer Wochen bis Monate wieder unter die Nachweisgrenze ab, können in Ausnahmefällen aber auch bis zu einigen Jahren persistieren) und zu

einem späteren Zeitpunkt der IgG- Nachweis wiederholt werden. Wenn sich die Patienten im Krankheitsstadium 1 oder 2 befinden, sind sie meistens positiv für IgG- Antikörper; bei erfolgreicher Therapie sinken die Antikörpertiter für gewöhnlich.

Da mit der Immunfluoreszenz eine Infektion mit *Borrelia burgdorferi* nicht von einer Infektion mit *Treponema pallidum* zu unterscheiden ist, müssen positive Ergebnisse einem TPHA- Test unterzogen werden; d.h., wenn der IFT positiv ist und der TPHA negativ ist, liegt eine Borrelieninfektion vor. Bei positivem TPHA sollte eine weitergehende Diagnostik mit *Treponema pallidum* IgM- und IgG- Marblot durchgeführt werden.

Des Weiteren muß beachtet werden, daß Kreuzreaktionen mit dem Epstein-Barr- Virus und dem Influenza- Virus zu falsch positiven Ergebnissen führen können, ebenso wie Autoimmunerkrankungen, MS und ALS.

Falsch negative Ergebnisse können durch frühzeitige Antibiotika- Behandlung hervorgerufen werden, da durch Antibiotikagabe eine Antikörperbildung unterdrückt werden kann.

Bei Einhaltung der Arbeitsvorschriften ergibt sich für die Auswertung und damit für den Nachweis von IgG- bzw. IgM- spezifischen Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* in Humanserum folgendes Beurteilungsschema:

Eine Patientenbande gilt als positiv, wenn sie stärker oder gleichstark der cut off- Bandenintensität ist. Die cut off- Bande für IgG ist 41 kD und für IgM 25 kD. Im Verlauf einer Borrelieninfektion können sich Antikörper gegen verschiedene Antigene ausbilden, die z. T. typisch für ein bestimmtes Erkrankungsstadium sind.

Hochspezifisch für eine Borrelieninfektion:

Bande 21, 25, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 37, 39 und 83 kD.

Wenig spezifisch für eine Borrelieninfektion:

Bande 18, 41, 45, 47, 55, 58, 60, 66, 75 kD.

In der folgenden Tabelle wird die Bedeutung der im Westernblot auftretenden Banden zusammengefaßt:

<i>Auftretende Banden/ kD</i>	<i>Bedeutung</i>	<i>Beurteilung/ Spezifität der Antikörper</i>
keine Bande	negativ	keine AK gegen B.burgdorferi nachweisbar
Bande 45, 47, 55, 58, 60, 66, 75	negativ	keine spezifischen AK gegen B. burgdorferi nachweisbar
nur Bande 41 oder Bande 41 und eine oder mehrere Banden 45, 47, 55, 58, 60, 66, 75	auffällig	Borrelieninfektion ist möglich, es kann sich auch um Infektion mit Treponema pallidum oder anderen begeißelten Bakterien handeln. TPHA- Test empfohlen und Verlaufskontrolle in 2-3 Wochen
nur Bande 25 oder Bande 25 und eine oder mehrere der Banden 45, 47, 55, 58, 60, 66, 75	auffällig	spezifische AK gegen B. burgdorferi nachweisbar; Infektion im Frühstadium sehr wahrscheinlich; Verlaufskontrolle in 2-3 Wochen
nur eine der hochspezifischen Banden 21, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 37, 39, 83 oder eine dieser Banden und eine oder mehrere der Banden 45, 47, 55, 58, 60, 66, 75	auffällig	Verdacht auf Borrelieninfektion; bei klinischem Verdacht auf Borreliose Verlaufskontrolle in 2-3 Wochen
Mindestens zwei hochspezifische Banden 21, 25, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 37, 39, 83	positiv	AK gegen B. burgdorferi nachweisbar. Eine Infektion mit B. burgdorferi ist sehr wahrscheinlich.

**Tabelle 6:** Bedeutung der auftretenden Banden im Westernblot

Zu den auftretenden Banden wurden im einzelnen folgende Charakteristika festgestellt:

Die 83 kD- Bande, deren Antigen ein Protein der Membran- Vesikel auf der Oberfläche von *Borrelia burgdorferi* bildet, ist hochspezifisch für *B. burgdorferi*.

Im allgemeinen treten diese Antikörper 6-12 Wochen nach Infektion auf. Sie sind typisch für das klinische Stadium 3, können aber auch in den Stadien 1 und 2 auftreten. Die 41 kD- Bande, deren Antigen das Flagellin- Protein ist, ist bedingt spezifisch für eine Borrelieninfektion. Es sind Kreuzreaktionen mit anderen Spirochäten und anderen begeißelten Bakterien möglich. Gewöhnlich tritt diese Bande sehr früh nach einer Infektion auf, verliert dann im Laufe der Infektion an Intensität und verschwindet bei älteren Borrelienerkrankungen vollständig.

Die 39 kD- Bande ist hochspezifisch für *Borrelia burgdorferi*. Die Antikörper lassen sich häufig schon sehr früh nach stattgefundener Infektion nachweisen.

Die 35 kD- Bande wird derzeit als spezifische Frühmarkerbande bewertet. Sie ist jedoch noch nicht ausreichend untersucht.

Die 34 kD- Bande, deren Antigen das Outer surface protein B (OspB) bildet, ist auch sehr spezifisch für *Borrelia burgdorferi*. Es entwickelt jedoch nur ein Teil der Patienten diese Antikörper. Allgemein sind sie erst in späteren Entwicklungsstadien nachweisbar.

Ebenfalls sehr spezifisch ist die 31 kD- Bande, deren Antigen das Outer surface protein A (OspA) bildet.

Das Outer surface protein C (OspC) ist ein hochspezifisches Protein für *Borrelia burgdorferi*, das durch die 25 kD- Bande nachgewiesen wird. Es erscheint sehr früh.

Die 28- und 29 kD- Bande, deren Antigen das OspD 29/ 28 darstellt, erscheinen häufig als Doppelbande, sie treten jedoch auch als Einzelbanden auf.



Die 21 kD- Bande wird ebenfalls als sehr spezifische Bande für *Borrelia burgdorferi* beschrieben; das Antigen weist Homologien mit OspC auf. Es ist ebenfalls häufig sehr früh nach einer Infektion nachweisbar.

Allgemein bzw. zusammenfassend ist zur Beurteilung der Patientenproben folgendes zu sagen:

1.) Banden, die stärker oder gleich der Cut- off Bandenintensität reagieren, werden als positiv bewertet.

2.) IgG- AK werden einige Wochen bis Monate nach Infektion erstmals gebildet und sind im Frühstadium einer Infektion oft noch nicht nachweisbar.

Deshalb sollte im Frühstadium einer Infektion eine IgM- oder IgA- Bestimmung durchgeführt werden und zu einem späteren Zeitpunkt eine Wiederholung der IgG- Bestimmung. Gewöhnlich sind Patienten im klinischen Stadium 2 oder 3 positiv für IgG- Antikörper. Bei Rekonvaleszenz sinken die Antikörper normalerweise ab.

3.) IgM- Antikörper treten gewöhnlich 1-8 Wochen nach Infektion auf; im Verlauf der Erkrankung sinken sie dann ab, können jedoch auch über Jahre persistieren.

4.) IgA- Antikörper sind Frühmarker einer Borrelieninfektion. Sie treten, sofern sie nachgewiesen werden, häufig noch vor den IgM- Antikörpern auf.

5.) Untersuchungen haben gezeigt, daß sich die Antikörperantwort und damit das Bandenmuster von Patient zu Patient unterscheidet. Es gilt allgemein, daß die Bandenanzahl mit der Dauer der Erkrankung zunimmt.

6.) Werden bei begründetem Verdacht auf Borrelieninfektion frühzeitig Antibiotika eingesetzt, so kann die Bildung von Antikörpern unterdrückt werden.

7.) Wie auch bei der Immunfluoreszenz muß berücksichtigt werden, daß es zu Kreuzreaktionen mit Treponemen, Leptospiren und anderen begeißelten Bakterien kommen kann. Ebenso ist das Auftreten von Borrelien- Antikörpern

bei EBV- Infektion, Autoimmunerkrankungen, MS, ALS, Influenza und Syphilis beobachtet worden.

8.) Aus den Beurteilungshinweisen ergibt sich, daß eine Diagnosestellung immer unter Berücksichtigung aller serologischer und klinischer Daten erfolgen sollte und nicht nur aufgrund einzelner Laborparameter.

Des Weiteren werden die Patientenseren nach der Bandenbeurteilung in ihrer Ergebniskonstellation aus IgG, IgM und IgA interpretiert (IgA wird bei dem untersuchten Patientenkollektiv nicht nachgewiesen; es ist aber prinzipiell möglich, IgA in die Befundung miteinzubeziehen. Es gibt einzelne Berichte, daß IgA eine höhere Sensitivität in der Diagnostik der Neuroborreliose hat, sowie besser zur Detektion von Antikörpern in der Frühphase geeignet ist. Für den routinemäßigen Einsatz von IgA besteht zur Zeit aber keine Indikation).

Folgende Tabelle stellt die Zusammenhänge bei der Beurteilung von Patientenseren bei der Kombination von IgG, IgM und IgA dar:

<i>Ergebnis der Marblot Bandenbeurteilung</i>				<i>Interpretation der Ergebniskonstellation aus IgG, IgM und IgA Marblot</i>
IgG	IgM	IgA	Gesamtbeurteilung	
negativ	negativ	negativ	negativ	Keine AK gegen B. burgdorferi nachweisbar; bei weiterem klinischen Verdacht Kontrolluntersuchung in 10- 14 Tagen
Negativ	Negativ	Positiv	Positiv	IgA bzw. IgM- AK gegen B. burgdorferi nachweisbar. Eine Borrelien- Infektion im Frühstadium ist wahrscheinlich. Verlaufskontrolle nach 2-3 Wochen
Negativ	Positiv	Negativ	Positiv	
Negativ	Positiv	Positiv	Positiv	

<b>Ergebnis der Marblot Bandenbeurteilung</b>				<b>Interpretation der Ergebniskonstellation aus IgG, IgM und IgA Marblot</b>
Positiv Positiv Positiv	Negativ Positiv Positiv	Positiv Negativ Positiv	Positiv Positiv Positiv	AK gegen B. burgdorferi nachweisbar. Akute Borrelioseninfektion sehr wahrscheinlich. Verlaufskontrolle nach zwei bis drei Wochen und auf IgG-, IgM- und IgA- AK untersuchen.
Positiv	Negativ	Negativ	Positiv	IgG- AK gegen B. burgdorferi nachweisbar; deshalb Verdacht auf Borrelioseninfektion. Es kann sich auch um das Spätstadium einer Erstinfektion oder um den Resttiter einer früheren (auch asymptomatischen) Infektion handeln.

**Tabelle 7:** Interpretation von Bandenkonstellationen aus IgG, IgM und IgA

Auffällige Ergebnisse:

Wenn mindestens ein Ergebnis positiv ist und ein oder mehrere Ergebnisse auffällig sind, wird nur das positive Ergebnis gewertet und nach oben angegebener Tabelle interpretiert.

Wenn kein Ergebnis positiv ist, aber ein oder mehrere Ergebnisse auffällig sind, besteht der Verdacht auf eine Borrelioseninfektion in der Frühphase. Es sollte daher 2- 3 Wochen nach der 1. Untersuchung eine Verlaufskontrolle durchgeführt werden und auf IgG, IgM und IgA untersucht werden.

### III.4. Statistische Analyse der Daten

Um eine Aussage über die statistischen Zusammenhänge zwischen dem jeweiligen Erkrankungsstadium der Borreliose und den festgestellten Testergebnissen zu machen, werden die Daten mit Hilfe der binär logistischen Regression analysiert.

Allgemein dient die Regressionsanalyse dazu, die Art des Zusammenhangs zwischen abhängiger und unabhängiger Variable zu ermitteln, d.h. man kann den Wert einer abhängigen Variablen aus den Werten unabhängiger Variablen vorhersagen.

Die binär logistische Regression prüft die Abhängigkeit einer dichotomen Variablen von anderen Variablen beliebiger Skalierung. Dabei handelt es sich bei der dichotomen Variablen normalerweise um ein Ereignis, das eintreten kann oder nicht. Mit Hilfe der binär logistischen Regression wird die Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines Ereignisses in Abhängigkeit von den Werten der unabhängigen Variablen berechnet.

Die Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines bestimmten Ereignisses wird nach folgender Formel berechnet:

$$p = \frac{1}{1 + e^{-z}}$$

Dabei steht  $z$  für:  $z = b_1 \times x_1 + b_2 \times x_2 + \dots + b_n \times x_n + a$

$b_i$  sind die Regressionskoeffizienten, die mit Hilfe der binär logistischen Regression berechnet werden.  $x_i$  sind die jeweiligen Werte der unabhängigen Variablen und  $a$  ist eine Konstante.

Ergibt sich für das so berechnete  $p$  ein Wert, der kleiner als 0,5 ist, so geht man davon aus, daß das Ereignis nicht eintritt. Im anderen Fall nimmt man das Eintreffen des Ereignisses an.

Überträgt man diese allgemeine Beschreibung auf die Daten aus den Patientenakten, so ergibt sich:

Abhängige, dichotome Variable ist der Westernblot, der als mögliches Ergebnis entweder positiv oder negativ ist.

Unabhängige Variablen sind in diesem Fall die Krankheitsstadien 1- 3 der Borreliose.

Mit Hilfe der binär logistischen Regression kann nun eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines positiven Testergebnisses im Westernblot in Abhängigkeit vom jeweiligen Krankheitsstadium gemacht werden.

Nicht eingeschlossen wurde in das Analyseverfahren das Krankheitsstadium 0, da es sich bei diesem um Patienten ohne klinische Diagnose einer Borreliose handelt; um wirklich sicher zu gehen, daß keine Borrelieninfektion vorliegt, wird als Ausschlußverfahren ein Westernblot durchgeführt.

Zusätzlich wurden Patienten aus der binär logistischen Regression ausgeschlossen, die durch einen positiven TPHA- Test (Luesserologie) oder einen positiven RF-Test (Rheumafaktornachweis) ein falsch positives Testergebnis hatten (Variable „Filter“ in der binär logistischen Regression).

## IV. Ergebnisse

### IV.1. Zusammengefaßte Darstellung der erhobenen Daten

In der nachfolgenden Tabelle findet sich die Aufstellung der verschiedenen klinischen Diagnosen, die nach Häufigkeiten, d.h. nach Anzahl der Patienten geordnet, zur Durchführung der Borrelienserologie führten:

<i>Stadium</i>	<i>Manifestation</i>	<i>Anzahl der Patienten</i>	<i>Anzahl der positiven serologischen Befunde</i>
1	a) Erythema chronicum migrans	a) 49	a) 42= 85,7%
2	a) Lymphadenosis cutis benigna b) Gelenkschwellung nach Zeckenbiß	a) 11 b) 5	a) 7= 63,6% b) 5= 100%
3	a) Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer b) Lichen sclerosus et atrophicus c) Morphea (circumscripte Sklerodermie)	a) 25 b) 10 c) 25	a) 18= 72% b) 5= 50% c) 16= 64%
sonstige klinische Diagnosen, die zur Durchführung der Borrelienserologie führten	a) Zeckenbiß ohne Erythema chronicum migrans b) Erytheme c) Erysipel d) sonstige Diagnosen (s. Text)	a) 27 b) 12 c) 9 d) 27	a) 9= 33,3%

**Tabelle 8:** Einteilung der verschiedenen klinischen Diagnosen

Erläuterung zu sonstigen klinischen Diagnosen:

Unter den insgesamt neun Patienten mit der klinischen Diagnose Erythem befanden sich zwei Patienten mit nodösen Erythemen an Unterschenkeln und Füßen; zwei Patienten hatten Teleangiektasien im Bereich der Wangen; drei Patienten hatten ein unklares Erythem im Bereich der Wangen und jeweils ein Patient hatte ein unklares Erythem im Bereich von Unterschenkel, Oberarm, Ferse und Fuß; desweiteren wurde ein Patient mit Pannikulitis diagnostiziert.

Bei neun Patienten führte die klinische Diagnose Erysipel zur Durchführung der Borrelienserologie.

Unter den insgesamt 27 Patienten, die unter sonstigen Diagnosen subsumiert wurden, befanden sich:

- vier Patienten mit Urtikaria
- drei P. mit Necrobiosis lipoidica
- drei P. mit Granuloma anulare
- zwei P. mit Raynaud- Syndrom
- zwei P. mit somatoformen Störungen
- zwei P. mit Dermatomyositis
- zwei P. mit Lymphoplasie
- zwei P. mit Lichen planus exanthematicus
- zwei P. mit Dermatitis
- ein P. mit Myogelosen
- ein P. mit Kollagenose
- ein P. mit allergisch bedingter Pharyngitis
- ein P. mit M. Reiter
- ein P. mit Psoriasis arthropathica

Von den insgesamt 201 untersuchten Patienten befanden sich 124 in den Stadien 1-3 der Borreliose; 94 dieser 124 Patienten hatten eine positive Borrelienserologie, d.h. 75,8% der untersuchten Patienten.

Bei der hier vorliegenden Studie wurde bei 25 der untersuchten 201 Patienten die klinische Diagnose Morphea gestellt. Zusätzlich wurde eine histologische Untersuchung der betroffenen Hautareale durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren durchgängig mit der klinischen Diagnose Morphea vereinbar.

Die serologischen Untersuchungen zeigten, daß bei 16 der insgesamt 25 Patienten (64%) mit der Diagnose Morphea die Borrelienserologie positiv war.

Bei sieben (43,75%) der 16 positiven Patienten mit Morphea war im Western-Blot für IgM die hochspezifische Bande 25 positiv, so daß bei diesen Patienten sicher eine Borrelieninfektion vorhanden war.

Dieses Ergebnis läßt eine Korrelation zwischen einer Infektion mit Borrelien und einer Erkrankung an Morphea vermuten.

#### **IV.2. Ergebnisse im Einzelnen**

Die nachfolgenden Kreuztabellen zeigen die serologischen Ergebnisse der Immunfluoreszenztests für IgM und IgG, sowie die Ergebnisse des Westernblots für IgM und IgG in Abhängigkeit von der klinischen Diagnose.

Aus den erstellten Tabellen kann jeweils die Sensitivität und die Spezifität der einzelnen Testverfahren abgelesen werden.

Durch Anwendung der binär logistischen Regression (s. Abschnitt III.4.) werden für den Westernblot die statistischen Zusammenhänge zwischen dem jeweiligen Stadium der Borrelienerkrankung und den ermittelten Testergebnissen analysiert.



## Immunfluoreszenztest für IgM

Es wurde bei 190 der insgesamt 201 Patienten ein Immunfluoreszenztest für IgM durchgeführt:

<i>Immunfluoreszenztest IgM</i>		<i>Klinische Diagnose</i>	
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
<i>negativ</i>	<i>- Anzahl</i>	45	115
	<i>- % der klinischen Diagnose</i>	86,5%	83,3%
<i>positiv</i>	<i>- Anzahl</i>	7	23
	<i>- % der klinischen Diagnose</i>	13,5%	16,7%
<i>gesamt</i>	<i>- Anzahl</i>	52	138
	<i>- % der Immunfluoreszenztest-Positiven für IgM</i>	27,4%	72,6%

**Tabelle 9:** Kreuztabelle Immunfluoreszenztest IgM und Klinische Diagnose

Bei IgM handelt es sich um einen Antikörper, der als frühe Antwort des Immunsystems auf eine Borrelieninfektion gewertet werden kann. IgM ist ca. zwei bis vier Wochen nach Infektion nachweisbar.

Immunglobuline der Gruppe M haben die Aufgabe, Fremdkörper zu neutralisieren und können aufgrund ihrer Konfiguration Zellen agglutinieren.

Von den insgesamt 190 Patienten (bei 11 Patienten wurde kein IFT für IgM durchgeführt) hatten 138 (72,6%) eine positive klinische Diagnose und 52 (27,4%) eine negative klinische Diagnose. Einen negativen IFT hatten 160 (84,2%) der 190 untersuchten Patienten und einen positiven IFT 30 (15,8%) der Untersuchten.

115 Patienten (83,3%) hatten trotz positiver klinischer Diagnose einen negativen Immunfluoreszenztest. Wie aus der oben angeführten Tabelle ersichtlich wird, ergab die Berechnung der Sensitivität (relativer Anteil richtig positiver Befunde bei den Kranken, d.h. 23 von 138 Patienten) für den IFT für IgM einen Wert von 16,7%.

45 (86,5%) der insgesamt 52 Patienten mit negativer klinischer Diagnose hatten auch eine negative Immunfluoreszenz. Wie in der Tabelle dargestellt, betrug die Spezifität, die den relativen Anteil richtig negativer Befunde bei den Gesunden darstellt, somit 86,5%.

### **Immunfluoreszenztest für IgG**

Wie in der Kreuztabelle dargestellt, wurde bei 190 (94,5%) der insgesamt 201 erfaßten Patienten ein Immunfluoreszenztest für IgG durchgeführt:

<i>Immunfluoreszenztest IgG</i>		<i>Klinische Diagnose</i>	
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
<i>negativ</i>	<i>-Anzahl</i>	39	74
	<i>- % der klinischen Diagnose</i>	75,0%	53,6%
<i>positiv</i>	<i>- Anzahl</i>	13	64
	<i>- % der klinischen Diagnose</i>	25,0%	46,4%
<i>gesamt</i>	<i>- Anzahl</i>	52	138
	<i>- % der Immunfluoreszenztest-Positiven für IgG</i>	27,4%	72,6%

**Tabelle 10:** Kreuztabelle Immunfluoreszenz IgG und Klinische Diagnose

IgG wird als Spätantwort des Immunsystems auf eine Borrelieninfektion gewertet. Die Antikörperbildung erfolgt ca. vier bis acht Wochen nach stattgefundener Infektion.

IgG ist mit 80% der häufigste Antikörper im Plasma. Aufgabe von IgG ist die Aktivierung des Komplementsystems und die Opsonierung, d.h. IgG bindet an zelluläre Oberflächenantigene. Die betroffenen Zellen können dadurch leichter phagozytiert werden.

Die Tabelle zeigt, daß von den 190 Untersuchten 138 Patienten (72,6%) eine positive und 52 (27,4%) eine negative klinische Diagnose hatten.

113 Patienten (59,5%) hatten einen negativen IFT für IgG und 77 Patienten (40,5%) einen positiven IFT.

Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, ergab sich bei 64 der 138 Patienten mit positiver klinischer Diagnose und positives Testergebnis. Das entspricht einer Sensitivität von 46,6%. Der Anteil der Patienten mit negativem IFT und negativer klinischer Diagnose betrug 39 von 52 und es errechnete sich damit eine Spezifität von 75%.

### **Westernblot für IgM**

Wie bereits beschrieben, wird im Anschluß an einen Immunfluoreszenztest ein Westernblot durchgeführt, um die klinische Diagnose Borrelieninfektion zu bestätigen.

Der Westernblot für IgM wurde bei 198 (98,5%) der 201 untersuchten Patienten durchgeführt:

<i>Westernblot IgM</i>		<i>Klinische Diagnose</i>	
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
<i>negativ</i>	<i>- Anzahl</i> <i>- % der klinischen</i> <i>Diagnose</i>	40 80,0%	71 48,0%
<i>positiv</i>	<i>- Anzahl</i> <i>- % der klinischen</i> <i>Diagnose</i>	10 20,0%	77 52,0%
<i>gesamt</i>	<i>- Anzahl</i> <i>- % von Western-</i> <i>blot- Positiven für</i> <i>IgM</i>	50 25,3%	148 74,7%

**Tabelle 11:** Kreuztabelle Westernblot IgM und Klinische Diagnose

Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, hatten 148 (74,7%) Patienten eine positive und 50 (25,3%) eine negative klinische Diagnose.

Von den 198 Untersuchten hatten 111 (56,1%) einen negativen und 87 (43,9%) einen positiven Westernblot.

77 der untersuchten Patienten mit positiver klinischer Diagnose hatten einen positiven Westernblot und somit errechnete sich eine Sensitivität von 52%.

40 der insgesamt 50 Patienten mit negativer klinischer Diagnose hatten einen negativen Westernblot, so daß sich eine Spezifität von 80% ergab.

### **Durchführung der binär logistischen Regression**

Zur statistischen Analyse wurde für den Westernblot für IgM und IgG, sowie für die Kombination beider Testverfahren die binär logistische Regression durchgeführt. Wie im Abschnitt III.4 beschrieben, kann mit Hilfe dieses

Analyseverfahren die Wahrscheinlichkeit des Eintreffens eines Ereignisses einer dichotomen Variablen in Abhängigkeit von den Werten einer unabhängigen Variablen erfaßt werden.

In die Auswertung der binär logistischen Regression für den Westernblot IgM wurden 141 der insgesamt 201 untersuchten Patienten einbezogen. Die anderen Patienten befanden sich im Stadium 0 (sonstige klinische Diagnosen/ Filter) oder fielen aufgrund von fehlender Durchführung des Westernblots heraus.

### **Logistische Regression für Westernblot IgM:**

Total number of cases: 142 (Unweighted)

Number of selected cases: 142

Number of unselected cases: 0

Number of selected cases: 142

Number rejected because of missing data: 1

Number of cases included in the analysis: 141

Dependent Variable.. WB\_IGM Westernblot, IgM

Beginning Block Number 0. Initial Log Likelihood Function

-2 Log Likelihood 195,46041

\* Constant is included in the model.

Beginning Block Number 1. Method: Enter

Variable(s) Entered on Step Number

1.. STADIUM Art des Stadium

Estimation terminated at iteration number 2 because  
Log Likelihood decreased by less than ,01 percent.

-2 Log Likelihood 188,410

Chi-Square df Significance

Model	7,051	1	,0079
Block	7,051	1	,0079
Step	7,051	1	,0079

Classification Table for WB\_IGM

The Cut Value is ,50

<i>observed</i> ( <i>tatsächlich beobachtete Ergebnisse</i> )	<i>predicted</i> ( <i>vorhergesagte Ergebnisse</i> )		
	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>percent correct</i>
<i>negativ</i>	44	27	61,97%
<i>positiv</i>	28	42	60,00%
<i>overall</i>			60,99%

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	S.E.	Wald	df	Sig	R	Exp(B)
STADIUM	-,4895	,1872	6,8360	1	,0089	-,1573	,6129
Constant	,9103	,3922	5,3889	1	,0203		

Die vorliegende statistische Analyse für den Westernblot IgM wurde mit Hilfe der Software „SPSS für Windows“ erstellt.

Die wesentlichen Ergebnisse werden im Folgenden erklärt:

Ziel des ersten Abschnitts des Testverfahrens ist die möglichst exakte Schätzung des Regressionskoeffizienten „b“ (Erläuterung s. Abschnitt III.4) mittels der Likelihood- Methode. Damit kann die Wahrscheinlichkeit „p“ des Eintreffens eines Ereignisses (abhängige Variable ist Westernblot positiv/negativ; unabhängige Variable ist die Erkrankung an einer Borrelieninfektion bzw. die Nichterkrankung) errechnet werden.

Der geschätzte Ausgangswert betrug bei der vorliegenden Analyse 195,46 und wird durch zwei Iterationen (schrittweises Rechenverfahren zur Annäherung an die exakte Lösung) auf den Wert 188,41 optimiert. Hierzu wird

der negative doppelte Wert des Logarithmus eingesetzt. Damit ist der neue negative doppelte Logarithmus um 7,05 kleiner als der Ausgangswert. Eine Abnahme des Wertes bedeutet eine Verbesserung der Anpassung.

Der Wert ist als sogenannter Chi- Quadrat- Wert in der Analyse aufgeführt. Weiter folgt eine Klassifikationstabelle, die die beobachteten Ergebnisse des Westernblots für IgM den vorhergesagten Ergebnissen gegenüberstellt.

Der Tabelle kann entnommen werden, daß 44 Testergebnisse richtig negativ sind und 27 falsch positiv. 42 Testergebnisse sind richtig positiv und 28 falsch negativ. Damit ergibt sich, daß von 141 durchgeführten Tests 86 korrekt beurteilt wurden (percent correct: 60,99%).

Am Schluß des Testverfahrens (variables in the Equation) werden die berechneten Koeffizienten und ihre Signifikanzüberprüfung ausgegeben; damit wird überprüft, ob zwischen dem Westernblot IgM und dem Krankheitsstadium der Borrelieninfektion ein signifikanter Zusammenhang besteht.

Es wird mit der Wald- Statistik überprüft, ob sich die errechneten Koeffizienten B (-0,4895 und 0,9103) signifikant von null unterscheiden. Die Wald- Statistik ist der quadrierte Quotient aus dem jeweiligen Koeffizienten und seinem Standardfehler (S.E.). Im vorliegenden Fall unterscheiden sie sich nicht signifikant von null. Mit Hilfe der beiden Koeffizientenwerte (Stadium und Konstante) kann die Wahrscheinlichkeit berechnet werden, mit der das Ergebnis des Westernblots (positiv/ negativ) in signifikantem Zusammenhang mit dem jeweiligen Erkrankungsstadium steht.

## Westernblot für IgG

Bei 198 der insgesamt 201 Patienten wurde ein Westernblot für IgG durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Kreuztabelle aufgeführt:

<i>Westernblot IgG</i>		<i>Klinische Diagnose</i>	
		<i>negativ</i>	<i>positiv</i>
<i>negativ</i>	<i>- Anzahl</i>	40	71
	<i>- % der klinischen Diagnose</i>	80,0%	48,0%
<i>positiv</i>	<i>- Anzahl</i>	10	77
	<i>% der klinischen Diagnose</i>	20,0%	52,0%
<i>gesamt</i>	<i>- Anzahl</i>	50	148
	<i>- % von Westernblot-Positiven für IgG</i>	25,3%	74,7%

**Tabelle 12:** Kreuztabelle Westernblot IgG und Klinische Diagnose

148 (74,7%) der Patienten hatten eine positive klinische Diagnose und 50 (25,3%) eine negative klinische Diagnose.

Die Tabelle zeigt, daß bei 111 (56,1%) der Untersuchten der Westernblot negativ war und bei 87 (43,0%) positiv.

77 der 148 Patienten mit positiver klinischer Diagnose wurden auch im Westernblot als positiv erkannt und somit errechnete sich eine Sensitivität von 47,9%.



Aus der Tabelle wird ersichtlich, daß 40 der 50 Patienten mit negativer klinischer Diagnose auch einen negativen Westernblot hatten. Es errechnete sich eine Spezifität von 80%.

### **Logistische Regression für Westernblot IgG**

Bei der binär logistischen Regression für den Westernblot IgG wurden 72 Patienten in das Analyseverfahren eingeschlossen.

Total number of cases: 72 (Unweighted)  
Number of selected cases: 72  
Number of unselected cases: 0

Number of selected cases: 72  
Number rejected because of missing data: 0  
Number of cases included in the analysis: 72

The variable FILTER\_\$ is constant for all selected cases.  
Since a constant was requested in the model,  
it will be removed from the analysis.

Dependent Variable.. WB\_IGG Westernblot, IgG

Beginning Block Number 0. Initial Log Likelihood Function

-2 Log Likelihood 99,312614

\* Constant is included in the model.

Beginning Block Number 1. Method: Enter

Estimation terminated at iteration number 2 because  
parameter estimates changed by less than ,001

-2 Log Likelihood 99,313

Classification Table for WB\_IGG  
The Cut Value is ,50

<i>observed (s.o.)</i>	<i>predicted (s.o.)</i>		
	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>percent correct</i>
<i>negativ</i>	0	33	0,0%
<i>positiv</i>	0	39	100,0%
<i>overall</i>			54,17%

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	S.E.	Wald	df	Sig	R	Exp(B)
Constant	,1671	,2365	,4988	1	,4800		

Wie bereits bei der binär logistischen Regression für IgM beschrieben, wird zunächst der Regressionskoeffizient möglichst genau geschätzt (negativer doppelter Logarithmus der Likelihood- Funktion: 99,3126). Es erfolgt eine verbesserte Annäherung an den Ausgangswert, so daß der neue Wert für den Regressionskoeffizienten 99,313 beträgt.

Nachfolgend erstellt das Programm die Klassifikationstabelle. Dieser Tabelle kann entnommen werden, daß 33 Testergebnisse falsch positiv sind und 0 Testergebnisse richtig negativ. 39 wurden richtig positiv beurteilt und 0 falsch negativ. Daraus ergibt sich, daß von insgesamt 72 durchgeführten Untersuchungen 39 (54,17%) richtig beurteilt wurden.

Im Anschluß an die Tabelle werden wieder die berechneten Koeffizienten und ihre Signifikanzüberprüfung ausgegeben. Wie auch bei dem Westernblot für IgM ergibt sich, daß sich das Ergebnis des Westernblots für IgG nicht signifikant von null unterscheidet (0,4800).

### **Logistische Regression für Westernblot Kombination**

In der nachfolgenden Analyse wurden die Westernblots für IgG und IgM kombiniert und überprüft, ob eine Kombination beider Testverfahren zu einer Erhöhung der Sensitivität führt.

Die statistische Analyse der Kombination der Testverfahren wurde für 142

Fälle durchgeführt.

Total number of cases: 142 (Unweighted)

Number of selected cases: 142

Number of unselected cases: 0

Number of selected cases: 142

Number rejected because of missing data: 1

Number of cases included in the analysis: 141

Dependent Variable Encoding:

Dependent Variable.. WB\_KOMBI Westernblot Kombination

Beginning Block Number 0. Initial Log Likelihood Function

-2 Log Likelihood 170,00334

\* Constant is included in the model.

Beginning Block Number 1. Method: Enter

Variable(s) Entered on Step Number

1.. STADIUM Art des Stadium

Estimation terminated at iteration number 3 because  
Log Likelihood decreased by less than ,01 percent.

-2 Log Likelihood 166,510

	Chi-Square	df	Significance
Model	3,493	1	,0616
Block	3,493	1	,0616
Step	3,493	1	,0616

Classification Table for WB\_KOMBI

The Cut Value is ,50

<i>observed (s.o.)</i>	<i>predicted (s.o.)</i>		
	<i>negativ</i>	<i>positiv</i>	<i>percent correct</i>
<i>negativ</i>	0	41	0,0%
<i>positiv</i>	0	100	100%
<i>overall</i>			70,92%

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	S.E.	Wald	df	Sig.	R	Exp(B)
STADIUM	-,3742	,2016	3,4448	1	,0635	-,0922	,6878
Constant	1,6251	,4496	13,0642	1	,0003		

Aus der durchgeführten binär logistischen Regression für eine Kombination der Testverfahren IgG und IgM ergibt sich:

Ausgangswert für den Regressionskoeffizienten war der geschätzte Wert des negativen doppelten Logarithmus der Likelihood- Funktion von 170,0034. Nach drei Iterationen konnte der Wert um 3,493 (wird als Chi- Quadrat aufgeführt) gesenkt und somit verbessert werden.

Aus der nachfolgenden Klassifikationstabelle kann man entnehmen, daß von 141 durchgeführten Tests 70,92% richtig beurteilt wurden. Null Tests wurden richtig negativ beurteilt und 41 Tests falsch positiv. 100 Tests wurden richtig positiv und null Tests falsch negativ beurteilt.

Für die berechneten Koeffizienten und ihre Signifikanzüberprüfung (Variables in the Equation) ergibt sich wiederum, daß sich die Koeffizienten nicht signifikant von null unterscheiden und somit kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Testergebnis der Kombination beider Westernblots und dem Krankheitsstadium besteht.

Im nachfolgenden Kapitel werden die erhobenen Daten hinsichtlich ihrer Verteilung bezüglich Geschlecht, Alter und Stadium der Borrelienerkrankung untersucht.

### **Häufigkeitsverteilungen nach Geschlecht**

In den nachfolgenden Tabellen werden die verschiedenen klinischen Stadien der Borrelieninfektion nach Geschlecht und Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Stadien eingeteilt.

#### **Einteilung für Patientinnen:**

<i>Art des Stadiums</i>	<i>Häufigkeit</i>	<i>Prozent der weibl. Untersuchten</i>
Stadium 1	25	20,0
Stadium 2	9	7,2
Stadium 3	48	38,4
sonstige Diagnosen	43	34,4
gesamt	125	100

**Tabelle 13:** Stadieneinteilung bei weiblichen Untersuchten

Wie aus der oben angeführten Tabelle ersichtlich wird, wurden insgesamt 125 weibliche Personen untersucht.

82 (65,6%) Patientinnen konnten den klinischen Stadien 1-3 zugeordnet werden; 43 (34,4%) mußten unter sonstigen Diagnosen subsumiert werden.

Mit 38,4% befanden sich die untersuchten Frauen am häufigsten im klinischen Stadium 3, welches für die Krankheiten ACAH, LSA und Morphea steht. 20,0% waren im klinischen Stadium 1- steht für Erythema migrans- und mit 7,2% befanden sich die Frauen am seltensten im Stadium 2; dieses steht für Lymphadenosis cutis benigna.

## Einteilung für Patienten:

<i>Art des Stadiums</i>	<i>Häufigkeit</i>	<i>Prozent der männl. Untersuchten</i>
Stadium 1	24	31,58
Stadium 2	7	9,21
Stadium 3	12	15,79
sonstige Diagnosen	33	43,42
gesamt	76	100

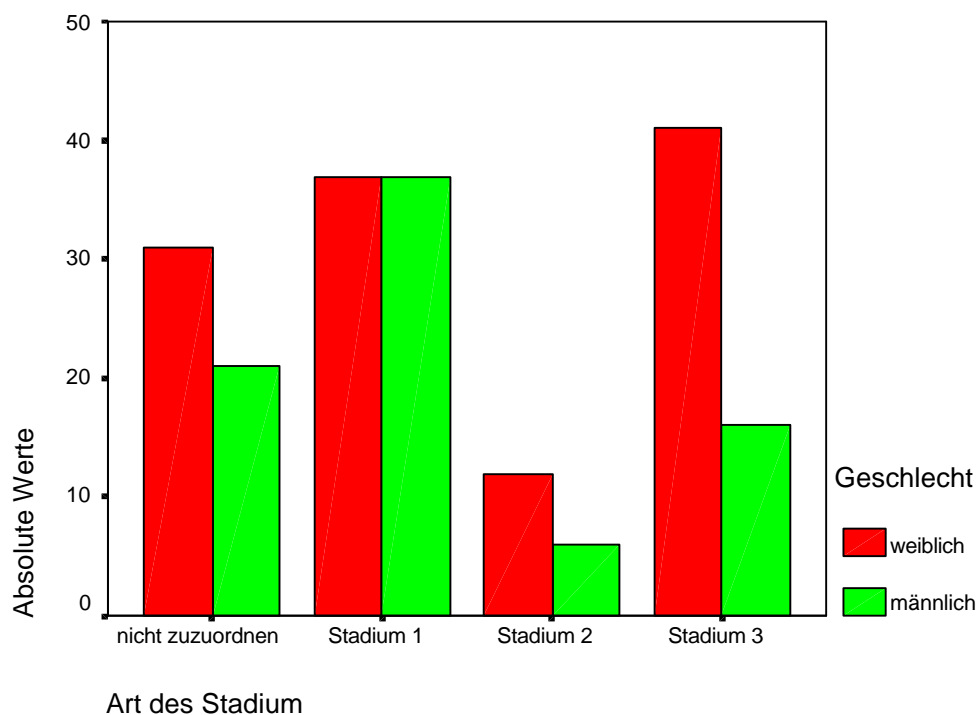
**Tabelle 14:** Stadieneinteilung bei männlichen Untersuchten

Von den 201 Untersuchten waren 76 (37,81%) Personen männlich.

Davon konnten 43 (56,58%) den Krankheitsstadien 1-3 der Borrelieninfektion zugeordnet werden; bei 33 Patienten (43,42%) erfolgte die Einteilung zu sonstigen Diagnosen.

Die männlichen Untersuchten befanden sich mit 31,58% am häufigsten im klinischen Stadium 1 und mit 9,21% am seltensten im Stadium 2.

Das nachfolgende Säulendiagramm stellt die einzelnen klinischen Stadien in Abhängigkeit vom Geschlecht der untersuchten Personen dar:



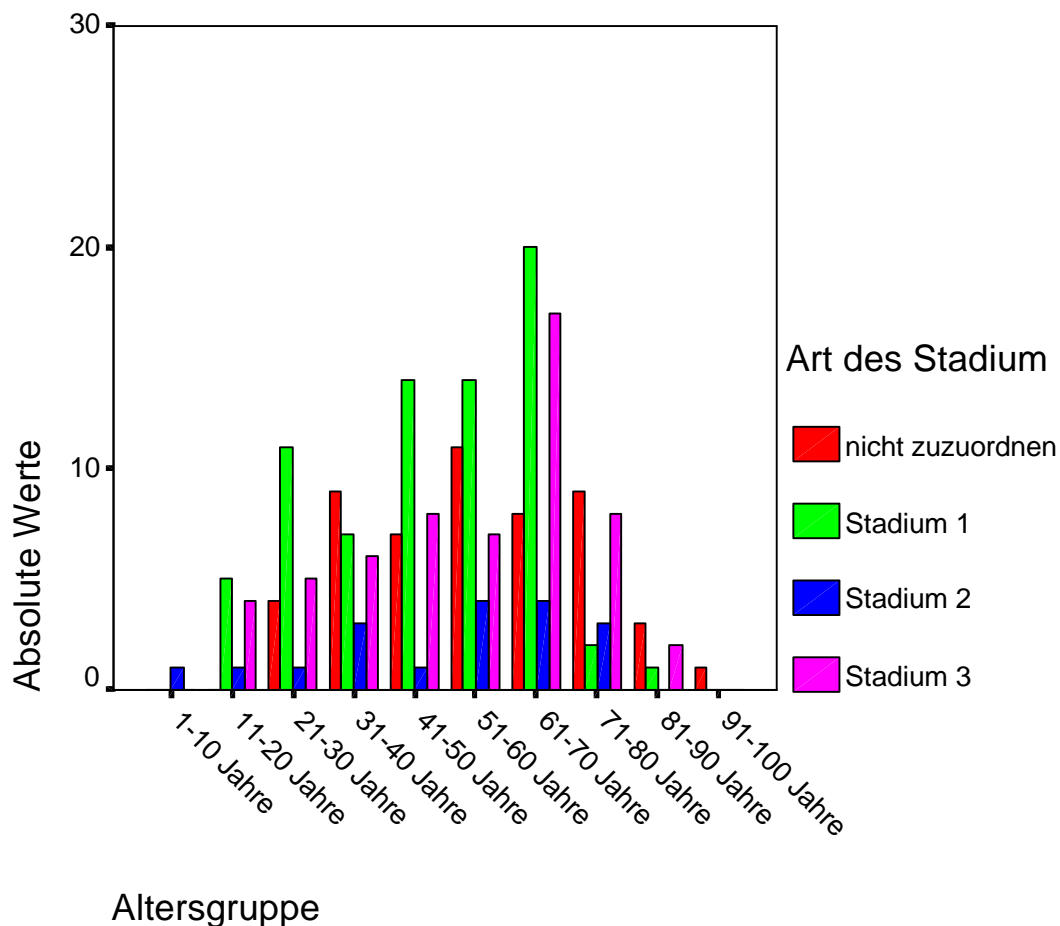
**Diagramm 1:** Klinisches Stadium in Abhängigkeit vom Geschlecht

Im Stadium 1 befanden sich - bezogen auf das Gesamtkollektiv - annähernd gleich viele weibliche und männliche Untersuchte, nämlich 12,44% weibliche und 11,94% männliche Untersuchte. Im Stadium 2 waren ebenfalls fast gleich viele weibliche wie männliche Untersuchte vertreten: 4,48% weibliche Patienten im Vergleich zu 3,48% männlichen Patienten. Im Stadium 3 überwogen mit 23,88% gegenüber 5,97% deutlich die weiblichen Untersuchten. Im Stadium „nicht zuzuordnen“ waren die Patientinnen mit 21,39% ebenfalls stärker als die männlichen Untersuchten mit 16,41% vertreten.

### **Häufigkeitsverteilung in Abhängigkeit vom Alter der Art des Stadiums**

In der folgenden Grafik werden die Patienten in Altersgruppen zu je 10 Jahren eingeteilt. Zusätzlich wird das jeweilige Krankheitsstadium erfaßt und dargestellt.

Man sieht, daß die Patienten im Alter von 61 bis 70 Jahren am stärksten vertreten waren und daß sich in der Gesamtheit der Altersgruppen die meisten Patienten im klinischen Stadium 3 (ACAH, LSA) befanden.



**Diagramm 2:** Klinische Stadien in Abhängigkeit von der Altersgruppe

Die nachfolgende Tabelle liefert eine zusätzliche Übersicht über die Häufigkeitsverteilungen in Abhängigkeit vom Durchschnittsalter und den verschiedenen Krankheitsstadien:

	<i>Krankheitsstadien</i>			
	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
<i>Anzahl n=</i>	76	49	16	60
<i>Durchschnittsalter gesamt in Jahren</i>	53,43	48,47	52,31	55,60
<i>Durchschnittsalter männl.</i>	51,27	45,92	56,14	55,58
<i>Durchschnittsalter weibl.</i>	55,09	50,92	49,33	55,60

**Tabelle 15:** Krankheitsstadien in Abhängigkeit vom Alter



Wie aus der Tabelle ersichtlich wird, gab es bei den weiblichen und männlichen Untersuchten keinen gravierenden Unterschied im Durchschnittsalter. Das Durchschnittsalter lag bei den Frauen mit Ausnahme des Stadiums 3 etwas höher. Das geringste Gesamtdurchschnittsalter hatten die Untersuchten im Stadium 1.

## V. Schlußbetrachtung

Das grundlegende Problem der serologischen Diagnostik von Borrelieninfektionen in Europa ist das bereits erwähnte Fehlen einer Standardisierung der verwendeten Testverfahren. Zusätzliche Probleme bereitet die Diversität der Borreliensämme, die mit ihren verschiedenen Antigenstrukturen ein einheitliches Testverfahren nicht zulassen.

Das Ergebnis eines serologischen Tests hat ohne den jeweiligen klinischen Befund und eine genaue Anamnese nur geringe Aussagekraft. Ein positives Testergebnis muß immer in der Zusammenschau mit der Klinik des Patienten interpretiert werden, um zu entscheiden, ob eine alte, ausgeheilte Borrelieninfektion vorliegt, oder ob es sich um eine aktive Infektion handelt.

Die Diagnose einer Borrelieninfektion sollte also hauptsächlich aufgrund klinischer und anamnestischer Kriterien erfolgen. Die serologischen Untersuchungen wie Immunfluoreszenztest und Westernblot können die Diagnose unterstützen, sofern sie bei klar definierter klinischer Fragestellung eingesetzt werden und das Patientenkollektiv eingeschränkt ist. Werden die Testverfahren nicht unter diesen Voraussetzungen eingesetzt, dann treten selbst bei hochspezifischen Testverfahren häufiger falsch positive als richtig positive Ergebnisse auf.

Auch für erfahrene Kliniker ist es schwierig, eine Borrelieninfektion klar als solche zu erkennen und das jeweilige Stadium der Infektion festzulegen, da die klinischen Verläufe stark in ihrer Erscheinungsform variieren und die einzelnen Stadien ineinander übergehen können. Die Festlegung des jeweiligen Stadiums ist jedoch für Therapie und Prognose der Erkrankung sehr wichtig.

Die Antibiotika- Therapie ist hinsichtlich Dauer der Behandlung, Dosierung und jeweiligem Wirkstoff (zur jeweiligen Antibiotika- Therapie siehe Tab. 3) von den einzelnen Borreliosestadien abhängig. Bei Patienten, bei denen eine Infektion fraglich ist und eine Antibiotikagabe aus prophylaktischen Gründen

erfolgt, könnte bei zuverlässigen serologischen Testverfahren das Antibiotikum eventuell eingespart werden.

Aufgrund der beschriebenen Probleme wäre ein serologisches Testverfahren als zusätzliche Entscheidungshilfe für die Diagnostik der Borrelieninfektionen sinnvoll.

Bisher liefern unterschiedliche Testverfahren bei gleicher Patientenprobe verschiedene Ergebnisse, und es wird beobachtet, daß bei gleichen Testverfahren verschiedene Labors unterschiedliche Ergebnisse liefern. Dies ist zum einen auf eine fehlende Festlegung von Positivitätskriterien der einzelnen Tests zurückzuführen und zum anderen auf eine mangelnde Einschränkung des Patientenkollektivs.

Auch in der vorliegenden Studie wurden bei 76 (37,81%) der 201 untersuchten Patienten serologische Untersuchungen durchgeführt, ohne daß ein klinisches Stadium (Stadium 1-3 der Borrelieninfektion) festgelegt werden konnte. Diese Untersuchungen wurden zum Ausschluß einer Borrelieninfektion bei unklarem klinischem Krankheitsbild durchgeführt bzw. bei Patienten, bei denen ein Zeckenbiß mit lokaler Infektion, aber ohne Erythema migrans vorlag. Bei insgesamt 27 Patienten lag ein Zeckenbiß ohne Erythema migrans vor und von diesen hatten 9 Patienten, d.h. 33,3% eine positive Borrelienserologie. Vergleicht man diese Testergebnisse mit denen der anderen klinischen Stadien, wie z.B mit dem Stadium 1 (Erythema migrans), bei dem die Seropositivität 85,7% betrug oder dem Stadium 3 (Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer) mit einer Seropositivität von 72%, so wird deutlich, daß die Testverfahren in der Frühphase einer Infektion schlecht einsetzbar sind. Dies beruht hauptsächlich darauf, daß im Stadium der lokalen Infektion noch keine Antikörper gegen Borrelien gebildet wurden. Verschiedene Autoren berichten über positive Testergebnisse zwischen 10 und 30% im Stadium der Lokalinfection. Somit spiegeln die hier gewonnenen Studienergebnisse die Erfahrungen der anderen Autoren wider. Zusätzlich muß berücksichtigt

werden, daß die Durchseuchung der europäischen Bevölkerung mit Borrelienantikörpern bei 10% liegt und bei besonders exponierten Personen wie z. B. Waldarbeitern bis zu 30% betragen kann.

In der Zusammenschau der Testergebnisse wird deutlich, daß die Testverfahren nur bei klar definierter klinischer Fragestellung eingesetzt werden sollten, um eine Hilfestellung in der Diagnostik der Borrelieninfektionen zu bieten.

Wie bereits erwähnt, wird von der WHO ein Minimum an Spezifität der Testverfahren von 98% gefordert. Wenn ein einzelnes Testverfahren dies nicht leisten kann, ist eine Kombination von Tests erforderlich. Bei der vorliegenden Studie wurde als Screening- Test ein Immunfluoreszenztest durchgeführt, der bei grenzwertigem oder positivem Testergebnis durch einen Westernblot ergänzt wurde.

Für den Nachweis von Immunglobulin M ergab sich im Immunfluoreszenztest eine Sensitivität von 16,7% und eine Spezifität von 86,5%. Die Ursache für den geringen Anteil an richtig positiven Ergebnissen bei definitiv Erkrankten ist unklar, da IgM als Frühantwort des Immunsystems zum Zeitpunkt des Antikörpernachweises bereits gebildet worden sein müßte. Dafür spricht auch, daß mit dem Westernblot eine Sensitivität von 52% erreicht werden konnte.

Der Antikörper Immunglobulin G, der vom Körper ca. 4 bis 8 Wochen nach Infektion gebildet wird, ergab im Immunfluoreszenztest eine Sensitivität von 46,6% und eine Spezifität von 75%.

Dennoch stellen diese Ergebnisse den Einsatz des Immunfluoreszenztests als Screeningtest in Frage. Ein Screeningtest sollte die Bedingung erfüllen, sozio-ökonomisch vertretbar zu sein und zum anderen eine ausreichende Sensitivität und Spezifität bieten. Er sollte möglichst wenig falsch positive Ergebnisse liefern, damit gesunde Personen nicht als krank eingestuft werden. Diese Voraussetzungen erfüllt der Immunfluoreszenztest jedoch nicht. Sicherlich würde man eine höhere Sensitivität und Spezifität erreichen, wenn man den

Test noch gezielter bzw. wie bereits beschrieben, nur bei Patienten einsetzen würde, die sich in einem definierten Krankheitsstadium befinden.

Beim Einsatz des Westernblots für Immunglobulin M ergab sich eine Sensitivität von 52% und eine Spezifität von 80%. Diese Ergebnisse liegen somit deutlich höher als die des Immunfluoreszenztests, bieten aber insgesamt immer noch kein befriedigendes Ergebnis. Der Westernblot für Immunglobulin G schnitt mit einer Sensitivität von 47,9% und einer Spezifität von 80% geringfügig schlechter ab. Auch der Westernblot sollte nur durchgeführt werden, sofern die Patienten einem der klinischen Stadien (1-3) der Borrelieninfektion zugeordnet werden können, um falsch positive Testergebnisse zu vermeiden.

Berechnet man die Gesamtspezifität aus Immunfluoreszenztest und Westernblot für Immunglobulin M so errechnet sich ein Wert von 83,25% und eine Sensitivität von 34,35%. Für Immunglobulin G ergibt sich eine Gesamtspezifität von 77,5% und eine Gesamtsensitivität von 47,25%.

Hiermit wird ersichtlich, daß auch durch eine Kombination der beiden angewendeten Testverfahren die von der WHO geforderte Sensitivität und Spezifität in der vorliegenden Studie nicht erreicht werden kann.

Vergleicht man die Ergebnisse der angewendeten Verfahren mit anderen Studienergebnissen wird deutlich, daß die Ergebnisse bezüglich der Spezifität von Testverfahren auch dort unzureichend sind. So berichtet Agger (Agger, 1997, S. 510-514), daß bei einem Studienkollektiv von 307 Patienten mit dem Immunfluoreszenztest eine Spezifität von 67-93% erreicht wurde, und daß falsch-positive Ergebnisse mit 20-40% häufig auftraten.

Eine andere Studie von Ledue (Ledue, 1996, S. 2343- 2350) zeigt, daß bei kombinierter Anwendung von ELISA und Westernblot die Sensitivität für IgM 80% und für IgG 81,8% betrug und die Spezifität für IgM 96,2% und für IgG 95,8%.

Die Betrachtung dieser Ergebnisse läßt vermuten, daß eine Kombination von ELISA und Westernblot bessere Ergebnisse liefert. Diese Annahme könnte man nur dadurch bestätigen, daß ein und dasselbe Patientenkollektiv direkt verglichen wird. Über kurz oder lang wird man unabhängig von den verschiedenen Testverfahren nicht umhinkommen, ein für Europa gültiges Serumpanel aufzubauen, wie dies in den USA durch das CDC (Center of Disease Control) bereits geschehen ist. Nur dadurch erreicht man eine Vergleichbarkeit unterschiedlicher Patientenproben und kann sichere Diagnosen stellen.

Die logistische Regression (stellt Zusammenhang zwischen jeweiligem Stadium der Infektion und Testergebnis dar) ergibt keinen signifikanten Zusammenhang für den Westernblot IgG und IgM bzw. die Kombination der beiden Testverfahren. Mit dem Signifikanzniveau wird normalerweise vor Durchführung eines bestimmten Testverfahrens die Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  festgelegt, d.h. mit welcher Wahrscheinlichkeit eines Irrtums dieser Test durchgeführt werden soll. In der Literatur übliche Irrtumswahrscheinlichkeiten bzw. Signifikanzniveaus sind  $\alpha= 0.05$  (5%),  $\alpha= 0,01$  (1%),  $\alpha= 0,001$  (1‰) und bei kritischen Problemstellungen auch beliebig geringere Signifikanzniveaus.

Diese werden aber bei dem durchgeführten Westernblot nicht eingehalten und damit kann bei dem vorliegenden Datensatz kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ergebnis des Testverfahrens und dem klinischen Krankheitsstadium festgestellt werden.

Seit langem wird über widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Ursache einer Erkrankung an Morphea berichtet. Einige Studien haben gezeigt, daß Borrelieninfektionen ursächlich sein könnten. In anderen Studien wurde diese Behauptung widerlegt.

Es wird berichtet, daß Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* in 50% eines untersuchten Patientenkollektivs mittels ELISA nachweisbar sind (Aberer et

al., 1995, S. 165- 170), wohingegen in der Kontrollgruppe bei keinem Patient eine Antikörperantwort nachweisbar ist.

Die gleiche Forschergruppe berichtet 1987, daß *B. burgdorferi* aus der Haut eines seropositiven Patienten mittels kulturellem Nachweis angezüchtet werden konnte, und daß in 3 von 15 Fällen *B. burgdorferi* in Gewebeproben von an Morphea erkrankten Personen nachgewiesen werden konnte.

Gleichzeitig berichten andere Forschergruppen (Hoesly et al.), daß nur bei einem von 25 Patienten mit Morphea positive Antikörpertiter im ELISA nachgewiesen wurden, wohingegen bei der gesunden Kontrollgruppe ein höherer Anteil an seropositiven Patienten auftrat. Aufgrund dieser widersprüchlichen Untersuchungsergebnisse wird diskutiert, daß die Testergebnisse hauptsächlich vom Alter der Patienten (je älter der Patient, desto größer die Wahrscheinlichkeit eines positiven Testergebnisses) und von geographischen Faktoren abhängen (in Amerika - vor allem Nordamerika- ist die Durchseuchungsrate mit *B. burgdorferi* geringer als in Europa). Es wird daher vermutet (Dillon, 1995), daß es zwischen dem Auftreten von positiven Testergebnissen und Morphea keinen Zusammenhang gibt.

Obwohl es sich bei den vorliegenden Daten hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen Morphea und einer Borrelioseninfektion um keine Fall- Kontroll-Studie handelt, ist eine Korrelation der Ergebnisse wahrscheinlich, da 16 (64%) der insgesamt 25 an Morphea erkrankten Patienten eine positive Borrelienserologie hatten. Mit 64% seropositiver Ergebnisse liegen diese deutlich über der durchschnittlichen Durchseuchung der Normalbevölkerung von 10%. Dieses Ergebnis müßte jedoch mittels Fall- Kontroll- Studien belegt werden.

Bezüglich der Häufigkeitsverteilungen der untersuchten Patienten läßt sich sagen, daß der Anteil an erkrankten Frauen mit einem Anteil von 62,19% deutlich höher als der der männlichen Untersuchten war (37,81%).

Frauen befanden sich mit 38,4% fast zweieinhalb mal so häufig im Stadium 3

(15,79% Männer). Frauen scheinen also häufiger an Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer zu erkranken.

Männer befanden sich mit 31,58% ca. eineinhalb mal häufiger im Stadium 1 (Frauen: 20%). Bei Männern könnte häufiger eine berufliche Exposition vorliegen. Weitere Auffälligkeiten in der prozentualen Verteilung der Erkrankungen gab es nicht.

Der Altersgipfel lag bei den 60- bis 70- jährigen Patienten, wobei das Gesamtdurchschnittsalter bei 52,78 Jahren lag. Vergleicht man die Altersverteilungen mit einer Untersuchung aus dem Gebiet Brandenburg aus dem Jahr 1997 (Talaska, Borreliose- Epidemiologie am Beispiel des Bundeslandes Brandenburg, S. 40- 47), so sind die gewonnenen Daten unauffällig. Bei dieser Studie in Brandenburg lag der Altersgipfel der Erkrankten bei den 50- bis 60- jährigen. Auch dort war mit 60% der Anteil an untersuchten Frauen deutlich höher (62,19% bei der vorliegenden Studie). Auffällig ist bei der vorliegenden Studie, daß das Gesamtdurchschnittsalter im Stadium 2 bei 52,31 Jahren liegt. Bei diesen Erkrankten wurde durchgängig die Diagnose Lymphadenosis cutis benigna gestellt. Diese Erkrankung ist wie beschrieben eine Erkrankung des Kindesalters und tritt bei Erwachsenen nur sehr selten und dann meistens im Bereich von Skrotum oder Mamille auf. Mit 16 erkrankten Patienten im Stadium 2 ist das Patientenkollektiv zu gering, als daß man allgemeingültige Schlüsse davon ableiten könnte.

Abschließend ist zu sagen, daß Neuentwicklungen serologischer Testverfahren zur Diagnose einer Borrelieninfektion wünschenswert und notwendig sind, da die bisherigen Ergebnisse serologischer Verfahren bezüglich Spezifität und Sensitivität unzureichend sind. Zusätzlich müssen bereits eingesetzte Testverfahren nach Vorbild des CDC (Center of Disease Control) weiter standardisiert werden. Außerdem wäre ein weiterer Schritt zur sicheren Prophylaxe einer Borrelieninfektion die Entwicklung eines Impfstoffs,



der in Endemiegebieten exponierten Personen einen Schutz bieten könnte (zur Problematik der Impfstoffentwicklung s. Kapitel I.4.1.).

Die Ergebnisse der Studie zeigen, daß die Nachweisgenauigkeit noch nicht auf dem gewünschten Niveau ist.

## **VI. Zusammenfassung**

Die Borreliosenkrankheit ist eine durch die Spirochäte *Borrelia burgdorferi* verursachte Multisystemerkrankung mit Befall von Organen und Organsystemen.

Am häufigsten befallen sind Haut, Herz, Nervensystem und Gelenke. Das Erkrankungsspektrum reicht dabei von milde verlaufenden Lokalinfectionen (Erythema migrans) bis zu chronisch progredienten Systemerkrankungen, wie z.B. der chronisch progredienten Enzephalomyelitis.

Das Bakterium *Borrelia burgdorferi* wird in Europa durch den Vektor *Ixodes ricinus* übertragen.

Man hat die Möglichkeit, das Bakterium direkt, die DNA, oder spezifische Antigene nachzuweisen; außerdem kann die Immunantwort des Organismus nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Studie werden als Nachweisverfahren der Immunfluoreszenztest und der Westernblot durchgeführt. Bisher gibt es kein standardisiertes Diagnoseverfahren und es treten immer wieder Probleme bei der Auswertung von Testverfahren auf.

Das Ziel der Studie ist die Darstellung der Sensitivität und Spezifität der verwendeten Testverfahren und der Nachweis eines signifikanten Zusammenhangs zwischen dem Ergebnis des durchgeführten Westernblots in Abhängigkeit von dem jeweiligen Krankheitsstadium der Borreliose. Zum Signifikanznachweis wird die binär logistische Regression durchgeführt. Zusätzlich wird untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Borrelieninfektion und der Erkrankung an Morphea besteht.

Die erhobenen Daten werden nach der Häufigkeitsverteilung der Geschlechter in den jeweiligen Erkrankungsstadien geordnet und es werden die Altersverteilungen in Abhängigkeit vom jeweiligen Erkrankungsstadium dargestellt.

Die statistische Analyse der Daten hat gezeigt, daß sowohl der Immunfluoreszenztest als Screeningverfahren als auch der Westernblot als zusätzliches diagnostisches Verfahren nicht die geforderte Sensitivität und Spezifität erreichen. Die für den WB angewendete binär logistische Regression zeigt, daß zwischen dem Ergebnis des WB (negativ oder positiv) und dem jeweiligen Erkrankungsstadium der Borreliose kein statistisch signifikanter Zusammenhang besteht.

Die Testverfahren können daher nur zur Unterstützung einer Diagnose dienen, die anamnestische und klinische Diagnoseerhebung aber nicht ersetzen.

Die Untersuchung der Korrelation zwischen einer Borrelieninfektion und Morphea zeigt bei den hier erhobenen Daten, daß ein Zusammenhang wahrscheinlich ist, da von insgesamt 25 an Morphea Erkrankten 16 Patienten (64%) eine positive Borrelienserologie hatten. Im Vergleich dazu beträgt die Seropositivität in der Bevölkerung ca. 10%. Zur Bestätigung dieser Aussage sind weitere Studien notwendig.

Die Ergebnisse der Häufigkeitsverteilungen werden im Teil Ergebnisse im einzelnen ausführlich beschrieben.

## VII. Anhang

### VII.1. Literaturverzeichnis

- Aberer, E.: Das dermatologische Spektrum der Lyme Borreliose. Wien Med. Wschr. 1995; 27: S. 165- 170
- Agger, W.A.: Clinical comparison of borreliacidal- antibody test with indirect immunofluorescence and enzyme- linked immunosorbent assays for diagnosis of Lyme disease. Mayo Clin. Proc. 1997 June; 72 (6): S. 510- 514
- Bamborschke, S. und Herpel, S.: Borrelien- PCR im Liquor und Urin; 2. Frankfurt- Gießener Borrelien- Workshop 1997, Abstract. In: Für die Praxis: Lyme- Borreliose (Hrsg.: Talaska, T.); DTP Atelier Dr. P. Krönert, Frankfurt (Oder), 1998, S. 49- 50
- Dillon, W.I.: Borrelia burgdorferi DNA is undetectable by polymerase chain reaction in skin lesions of morphea, scleroderma, or lichen sclerosus et atrophicus of patients from North America. J AM ACAD DERMATOL 1995; 33: S. 617-620
- Dressler, F., und Stöhr K.: Lyme Borreliose- Empfehlungen für Brandenburg. In: Für die Praxis: Lyme- Borreliose (Hrsg.: Talaska, T.); DTP Atelier Dr. P. Krönert, Frankfurt (Oder), 1998, S. 70- 71
- Goodman, J.L.: Polymerase Chain Reaction for Tick-Borne Diseases: Past, Present and Future: VII: International Congress on Lyme Borreliosis, San Francisco 1996; Plenary Session Laboratory Diagnosis. In: Für die Praxis: Lyme- Borreliose (Hrsg.: Talaska, T.); DTP Atelier Dr. P. Krönert, Frankfurt (Oder), 1998, S. 49- 50
- vgl. Güthoff, W.: Borreliosen in der Inneren Medizin- Klinik und Therapie. In: Für die Praxis: Lyme- Borreliose (Hrsg.: Talaska, T.); DTP Atelier Dr. P. Krönert, Frankfurt (Oder), 1998, S. 81

- Harris, N.S., und Boyd, G.S.: Detection of *Borrelia burgdorferi* Antigen in Urine from Patients with Lyme Borreliosis. In: Für die Praxis: Lyme-Borreliose (Hrsg. Talaska, T.); DTP Atelier Dr. P. Krönert, Frankfurt (Oder), 1998, S. 50
- vgl. Hassler, D.: Stadiengerechte Therapie der Borreliose. In: Für die Praxis: Lyme- Borreliose (Hrsg.: Talaska, T.); DTP Atelier Dr. P. Krönert, Frankfurt (Oder), 1998, S. 100
- Hoesly, J.M. et al.: Localized scleroderma (morphea) and antibody to *Borrelia burgdorferi*. J AM ACAD DERMATOL 1987; 17: S. 455-458
- Kamradt, T.: Die Lyme- Arthritis: Klinik, Diagnose und Therapie. Deutsches Ärzteblatt 95, Heft 5, 1998, S. 217
- Karsten, A., Ohlenbusch, A., Thomssen, R. und Eiffert, H.: Anwendung der PCR zur Diagnose der Lyme- Borreliose und zur Typisierung des Erregers; 2. Frankfurt- Gießener Borrelien- Workshop 1997, Abstract. In: Für die Praxis: Lyme- Borreliose (Hrsg.: Talaska, T.); DTP Atelier Dr. P. Krönert, Frankfurt (Oder), 1998, S. 49- 50
- Ledue, T.B.: New laboratory guidelines for serologic diagnosis of Lyme disease: evaluation fo the two- test protocol. J Clin Microbiol 1996; 34 (10): S. 2343- 2350
- Ryan, R. W., und Tilton, R. C.: The Laboratory Diagnosis of Lyme Disease. J. Clin. Immun. 1993; 16 (3), S. 208- 214. In: Für die Praxis: Lyme- Borreliose (Hrsg.: Talaska, T.); DTP Atelier Dr. P. Krönert, Frankfurt (Oder), 1998, S. 65
- Simon, M.M.: Lyme disease: pathogenesis and vaccine development. Zentralbl. Bakteriolog. 1999; 289 (5-7): S. 690- 695
- vgl. Talaska, T.: Die Erreger- Klassifikation, Vorkommen und klinische Relevanz. Für die Praxis: Lyme- Borreliose (Hrsg.: Talaska, T.); DTP Atelier Dr. P. Krönert, Frankfurt (Oder), 1998 a, S. 13

- vgl. Talaska, T.: Lyme- Borreliose- Prävention in Deutschland. Für die Praxis: Lyme- Borreliose (Hrsg.: Talaska, T.); DTP Atelier Dr. P. Krönert, Frankfurt (Oder), 1998 b, S. 31- 33
- vgl. Talaska, T.: Diagnostische Methoden bei Borrelien- Infektionen- Übersicht. Für die Praxis: Lyme- Borreliose (Hrsg.: Talaska, T.); DTP Atelier Dr. P. Krönert, Frankfurt (Oder), 1998 c, S. 55
- vgl. Talaska, T.: Diagnostische Methoden bei Borrelien- Infektionen- Übersicht. Für die Praxis: Lyme- Borreliose (Hrsg.: Talaska, T.); DTP Atelier Dr. P. Krönert, Frankfurt (Oder), 1998 d, S. 48
- WHO Workshop on Lyme Borreliosis Diagnosis and Surveillance, Warsaw, Poland, 1995. WHO/ CDS/ VPH/95: S. 141. In: Für die Praxis: Lyme- Borreliose (Hrsg.: Talaska, T.); DTP Atelier Dr. P. Krönert, Frankfurt (Oder), 1998, S. 65
- Wahlberg, P.: Vaccination against Lyme borreliosis. Ann. Med. 1999; 31 (4): S. 233-235

### **VII.3. Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Christiansen, Daut, Engel, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Habermehl, Happle, Hesse, Kälble, Kern, Klenk, Koolman, Krause, Krieg, Lennartz, Mueller, Oertel, Remschmidt, Schachtschabel, Schäfer, Schulz, Seifart, Steiniger, Stinner, Thomas, Weihe, Werner an der Philipps-Universität in Marburg, von Schönfeldt an der Universität zu Köln und Krüger an der Universität von Pretoria (Südafrika).

#### **VII.4. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. W. Krause, der mich stets innerhalb kürzester Zeit mit wertvollen Verbesserungsvorschlägen unterstützt hat und mir immer freundlich mit Rat und Tat zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. med. U. Wentscher bedanken, die mir vor allem in der Anfangsphase meiner Dissertation mit vielen nützlichen Ratschlägen geholfen hat und viele konstruktive Vorschläge hatte.

Außerdem gilt mein Dank Frau I. Kißling, die mich stets darin unterstützt hat, dass mir die benötigten Patientenakten zur Verfügung standen.

Zusätzlich möchte ich mich bei M. Schlesner bedanken, der die Dissertation Korrektur gelesen hat.