

Borreliose: Möglichkeiten und Perspektiven der Diagnostik

Inke Krupka¹, Michael Bechtel², Ute Loehnert-Thiel², Ragnhild Eppendorff², Reinhard K. Straubinger¹
1Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie, Veterinärwissenschaftliches Departement, LMU München; 2Sekisui Virotech GmbH, Rüsselsheim

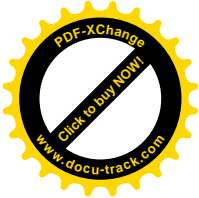
Einleitung

Durch Zecken übertragene Infektionen ausgelöst durch Spezies des *Borrelia-burgdorferi*-sensu-lato-Komplexes (*Bbsl*) können in Europa die Lyme-Borreliose beim Menschen hervorrufen. Auch bei Hunden kann eine Infektion zu klinischen Erkrankungen führen, was aber bisher nur für die Spezies *B. burgdorferi* sensu stricto (*Bbss*) zweifelsfrei bewiesen wurde (1,4,5). In den letzten Jahren häuften sich Hinweise für die Infektionsfähigkeit von Pferden mit diesen Spirochäten, die unter experimentellen Bedingungen für *Bbss* gezeigt wurde (2). Kürzlich konnten im Großhirn von zwei Pferden mit neurologischen Veränderungen Borrelien-ähnliche Strukturen in den Leptomeningen und der *Dura mater* entdeckt werden, wobei auch mittels PCR dieser Gewebe die DNA von *Bbss* nachweisbar war (3). Die Untersuchung hinsichtlich einer potenziellen Borrelien-Infektion wird in Deutschland seitens der Tierbesitzer und Tierärzte mit der Diskussion um eine klinische Erkrankung bei Pferden („Equine-Lyme-Borreliose“) zunehmend eingefordert und stellt Laboratorien vor neue Herausforderungen. Der empfohlene Nachweis von Antikörpern gegen *Bbsl* bei Mensch und Hund ist der Zweistufen-Test, bestehend in erster Stufe aus einem hochsensitiven ELISA. Dieser dient vorwiegend der Erkennung negativer Seren, deren Untersuchung damit abgeschlossen ist. Im positiven Falle werden in einer zweiten Stufe die reaktiven Seren durch einen Western-Blot genau charakterisiert. Dies ist bei kaninen Seren auch deshalb wichtig, da hier zusätzlich zwischen impf- und infektionsspezifischen Immunreaktionen unterschieden werden muss. Während für Hunde seit mehreren Jahren zugelassene, spezielle Western-Blot-Systeme auf der Basis von Lysatproteinen oder rekombinanten Proteinen verfügbar sind, ist das bei Pferden nicht der Fall. Begründet ist dies zum einen durch die wissenschaftlich nicht eindeutig kategorisierbare klinische Ausprägung der Lyme-Borreliose bei serologisch positiven Pferden, zum anderen durch die schwierig zu interpretierenden Immunreaktionen gegenüber Borrelien-Proteinen:

- So reagieren nach unseren Erfahrungen Pferdeseren im Borrelien-Lysat-Antigen-Western-Blot häufig mit Proteinen der Größen 83/100 kDa, 75 kDa, 60 kDa und 41 kDa. Diese Immunreaktionen sind vorwiegend gegen unspezifische Hitzeschockproteine sowie Flagellenproteine der Borrelien gerichtet.
- Equine Seren reagieren teilweise deutlich mit einem ca. 31 kDa großen Protein (wahrscheinlich OspA).
- Pferdeseren reagieren häufig schwach bis mittelgradig mit dem rekombinant hergestellten Borrelien-Protein VlsE. In der serologischen Diagnostik bei Hunden und Menschen gilt VlsE als spezifischer Infektionsmarker, da das Protein nur in vivo von lebenden Borrelien exprimiert wird. Somit ist nach wie vor unklar bzw. fraglich, ob VlsE bei equinen Immunreaktionen als ein ausreichend spezifischer Infektionsmarker angesehen werden kann.

Material und Methoden

Seren von Hunden und Pferden wurden mit Hilfe eines etablierten Zweistufen-Testsystems (ELISA + Western-Blot) folgenden Befundgruppen zugeordnet: „Negativ“, „Grenzwertig“, „Infektion“ sowie für den Hund zusätzlich zu „Impfung“, „Impfung + Infektion“. Darauffolgend wurden insgesamt 217 kanine und 149 equine Seren mittels des „Borrelia Veterinär plus OspA LINE“ (BV+OspA-LINE; Sekisui



Virotech GmbH) untersucht. Bei dem Line-Testsystem handelt es sich um einen serologischen Test auf Basis des IgG-Western-Blots. Die unterschiedlichen Borrelien-Proteine (Antigene) werden auf Nitrozellulosemembran-Streifen durch ein spezielles Sprühverfahren aufgebracht. Es erlaubt im Vergleich zum klassischen Testsystem das Aufbringen verschiedener, räumlich voneinander abgegrenzter Antigene in unterschiedlichen Konzentrationen oder Präparationen. Die aufgetragenen Antigene waren: VlsE Mix dog, OspA Mix (entspricht der Cut-off-Bande Hund), DbpA Mix, OspC Mix, 39 kDa (BmpA), 58 kDa, 83 kDa, VlsE Mix horse (entspricht der Cut-off-Bande Pferd).

Ergebnisse

Untersuchung kaniner Seren

Alle mit dem Zweistufen-Testsystem bereits als negativ für spezifische Antikörper gegen *Bbsl* eingestufte kanine Seren (n = 49) konnten mit dem BV+OspA-LINE wieder als negativ klassifiziert werden. Insgesamt wurden aber 52 Seren als negativ eingestuft. Ein Serum wurde im Zweistufen-Test als „Impfung schwach“ vermerkt, was durch eine sehr schwache OspA-Reaktion auf den Nitrozellulosestreifen verursacht wurde. Im BV+OspA-LINE zeigte sich aber eine Reaktion auf OspA Mix deutlich unterhalb des Cut-offs, weshalb das Serum als negativ bewertet werden konnte. Zwei weitere als negativ erachtete Seren wurden mit dem Zweistufen-Testsystem als grenzwertig eingestuft; im BV+OspA-LINE zeigten sich allerdings nur schwache Proteinbanden bei VlsE Mix Hund und OspC, die unterhalb des Cut-off lagen.

Innerhalb der Gruppe von Seren mit durch Impfung induzierten Antikörpern (n = 46) wurden mit dem BV+OspA-LINE für 42 Seren die Impfung bestätigt. In drei Fällen hingegen ergab sich durch Reaktionen mit VlsE Mix dog der Befund „Impfung + Infektion“. Ein Serum wurde als „Negativ“ bewertet (siehe oben). Dies bedeutet in der Gruppe „Impfung“ eine Diskrepanz von 8,7 % gegenüber dem Zweistufen-Test. Bei Betrachtung der Proteinbandensignale in der Gruppe „Impfung“ ist erkennbar, dass OspA Mix bei 100 % dieser Seren Antikörper detektieren kann.

Im Zweistufen-Test wurden acht kanine Seren als „Grenzwertig“, mit dem BV+OspA-LINE nun aber der Gruppe „Infektion“ zugeordnet, da die Ausprägung der infektionsspezifischen Proteinbanden im Western-Blot schwach war, bzw. auf eine eventuell latente Infektion hindeutete. Die Diskrepanz beträgt innerhalb der Gruppe „Grenzwertig“ 87,5 % gegenüber dem Zweistufen-Test.

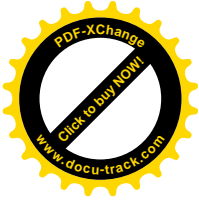
Von den im Zweistufen-Testsystem als „Infektion“ eingeordneten Seren (n = 94) wurden mit dem BV+OspA-LINE 90 Seren ebenfalls der Infektion zugeordnet, was einer Übereinstimmung von 95,7 % entspricht. Drei Seren wurden neu als „Impfung + Infektion“ bewertet. Mittels des BV+OspA-LINE wurden insgesamt 96 Hundeseren als Infektion eingestuft. Dabei wurden bei 100 % der Seren Antikörper gegen VlsE Mix dog detektiert, gefolgt von 86,5 % der Seren, die positiv mit p83 reagierten.

Untersuchung equiner Seren

Unter Verwendung des BV+OspA-LINE konnten alle ursprünglich negativ bewerteten equinen Seren (n = 50) ebenfalls wieder negativ (n = 50) eingestuft werden. Bezogen auf alle untersuchten Seren (n = 149), wurden mit den neuen Auswertungskriterien aber deutlich mehr Seren als negativ eingestuft (n = 82) als dies im Zweistufen-Test auf der Basis von Borrelien-Lysatantigen + VlsE der Fall war.

Demgegenüber steht die nun deutlich verringerte Zahl an Seren (n = 16 gegenüber n = 50), die als „Grenzwertig“ eingestuft wurden. Mit dem VlsE Mix horse wird eine höhere Spezifität erreicht.

Dagegen zeigt sich in der Gruppe als „Infektion“ eingestufte Seren (n = 40) nicht nur eine erhöhte Reaktivität gegenüber p39 (37,5 %) und p58 (35,0 %), sondern auch eine deutliche Dominanz der Antikörper gegen DbpA (97,5 %), die dagegen bei negativen Seren (6,1 %) und grenzwertigen Seren



(7,4 %) in geringerem Maße nachweisbar waren. Damit erweist sich DbpA als ein geeignetes Protein für die Detektion von equinen Antikörpern gegen *Bbsl*. Interessant erscheint zudem der Aspekt, dass die in der Gruppe als „Infektion“ eingestuftten zehn Seren die Proteinbandenkombination VIsE Mix horse + DbpA + p83 aufwiesen. Dies entspricht einem Anteil von 25 % der Gruppe „Infektion“. Aus diesem Grund wurde die Bandenkombination „VIsE + DbpA plus eine Bande“ letztendlich in die Auswertungskriterien für den BV+OspA-LINE integriert. Die Reaktivitäten gegenüber OspC waren in allen drei Befundkategorien vertreten und unterstreichen die Feststellung, dass Antikörper gegen dieses Protein bei equinen Serumreaktionen nicht als spezifisch zu interpretieren sind. Auch waren Antikörper gegen OspA (31 kDa) in allen drei Befundkategorien bei einzelnen Seren detektierbar, was aber ebenfalls als unspezifisch eingestuft werden kann. Weithin kann die hohe Reaktivität von VIsE in Kombination mit den Banden p83 und/oder DbpA wertvolle Hinweise auf einen infektionsbedingten Antigenkontakt mit *Bbsl*-spezifischen Antigenen in equinen Seren geben.

Diskussion und Schlussfolgerungen

Das BV+OspA-LINE Testsystem erwies sich auf Grund seiner spezifischen Auswertungskriterien für Hund und Pferd sowie die Verwendung von speziesspezifischen VIsE-Präparationen als wertvolles Diagnostikum zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen *Bbsl*. Die Verwendung von nativen oder rekombinanten, aufgesprühten Proteinen in deutlich reduzierter Zahl gegenüber Lysatprotein-Präparationen erleichtert die Interpretation. Daraus ergibt sich allerdings auch die Notwendigkeit einer sensiblen Überwachung der verwendeten Proteinkonzentrationen.

Literaturverzeichnis

1. Appel MJG, Allen S, Jacobson RH, Lauderdale T-L, Chang Y-F, Shin SJ, Thomford JW, Todhunter RJ, Summers BA. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *J Infect Dis.* 1993;167:651-64.
2. Chang YF, Novosol V, McDonough SP, Chang CF, Jacobson RH, Divers T, Quimby FW, Shin S, Lein DH. Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to Ixodid ticks. *Vet Pathol.* 2000;37(1):68-76.
3. Imai DM, Barr BC, Daft B, Bertone JJ, Feng S, Hodzic E, Johnston JM, Olsen KJ, Barthold SW. Lyme Neuroborreliosis in 2 Horses. *Vet Pathol* 2011.
4. Straubinger RK, Straubinger AF, Härter L, Jacobson RH, Chang Y-F, Summers BA, Erb HN, Appel MJG. *Borrelia burgdorferi* migrates into joint capsules and causes an up-regulation of interleukin-8 in synovial membranes of dogs experimentally infected with ticks. *Infect Immun.* 1997;65(4):1273-85.
5. Straubinger RK, Straubinger AF, Summers BA, Jacobson RH, Erb HN. Clinical manifestations, pathogenesis, and effect of antibiotic treatment on Lyme borreliosis in dogs. *Wien Klin Wochenschr.* 1998;110(24):874-81.

Kontaktadresse

Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D., Veterinärwissenschaftliches Department, Lehrstuhls für Bakteriologie und Mykologie, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, Tierärztliche Fakultät, LMU München, R.Straubinger@lmu.de