

**Analyse erregerspezifischer Antikörper und ihrer
IgG-Subklassen bei Borrelia burgdorferi Infektionen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Astrid Monika Jung
aus Geislingen / Steige

Gießen 1997

Analyse erregerspezifischer Antikörper und ihrer IgG-Subklassen bei *Borrelia burgdorferi* Infektionen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Astrid Monika Jung
aus Geislingen / Steige

Gießen 1997

Aus dem Medizinischen Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Leiter: Prof. Dr. med. H.-J. Wellensiek
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Wellensiek

Gutachter: Prof. Dr. Dorndorf

Tag der Disputation: 8. Juni 1999

Diese Arbeit ist meinem Verlobten, Thorsten König,
und meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Was versteht man unter einer Lyme-Borreliose	4
1.2 Klinische Verläufe der Lyme-Borreliose.....	5
1.3 Serologische Diagnostik	6
1.4 Die IgG-Subklassen: biologische Aktivität, Regulation und Nachweis	10
1.5 Ziel und Fragestellung der Arbeit.....	15
2. Material	17
2.1 Patientengut	18
2.2 Vorbereitung des Materials.....	18
3. Labormethoden	19
3.1 Immunfluoreszenz-Test (IFT) und IFT-Absorptions-Test (IFT-ABS).....	19
3.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	22
3.3 Borrelienspezifischer Immunoblot zum IgM- und IgG-Nachweis	24
3.4 Quantitative Bestimmung der Gesamt-IgG-Subklassenmenge mit Hilfe der Nephelometrie	32
4. Statistische Auswertung	34
4.1 Methoden.....	34
4.2 Box- und Whisker-Plots	34
4.3 Darstellung der statistischen Auswertung der Immunoblots	36
5. Ergebnisse	37
5.1 Qualitative Analyse der IgG-Subklassen im Westernblot	37
5.1.1 Reaktionsprinzip	37
5.1.2 Vorbereitung des IgG-Subklassen-Blots.....	37
5.1.3 Durchführung des IgG-Subklassen-Blots mit polyklonalen Antikörpern.....	39
5.1.4 Durchführung des IgG-Subklassen-Blots mit monoklonalen Antikörpern.....	42
5.2. Darstellung der klinischen und serologischen Ergebnisse bei der symptomatischen Patienten- gruppe im Querschnitt und im Verlauf.....	45
5.2.1 Ergebnisse aller symptomatischen Patienten	45
5.2.2. Ergebnisse der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1.....	47
5.2.3 Ergebnisse der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2.....	51
5.2.4 Ergebnisse der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3.....	54
5.2.5 Vergleich der Patienten mit einer symptomatischen Borreliose aus den verschiedenen Krankheitsstadien.....	57
5.3 Darstellung der klinischen und serologischen Ergebnisse bei der asymptomatischen Patientengruppe im Querschnitt und im Verlauf	65
5.3.1 Klinische Ergebnisse der asymptomatischen Patienten	65
5.3.2 Ergebnisse der IgG-Subklassen Nephelometrie bei asymptomatischen Patienten.....	66
5.3.3 Ergebnisse des ELISA, IFT, und IFT-ABS bei asymptomatischen Patienten.	67

5.3.4 Ergebnisse des IgM- / IgG-Western-Blot bei asymptomatischen Patienten	67
5.3.5 Ergebnisse der IgG-Subklassen-Blots bei asymptomatischen Patienten	68
5.4 Vergleich der Ergebnisse der Probanden mit symptomatischer und asymptomatischer Borrelien-Infektion	70
5.4.1 Vergleich von Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1 mit asymptomatischen Probanden....	71
5.4.2 Vergleich von Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 mit asymptomatischen Probanden ...	73
5.4.3 Vergleich von Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 mit asymptomatischen Probanden ...	76
6. Diskussion.....	78
7. Zusammenfassung	94
8. Literatur	95
9. Anhang	104
Anhang 1: Reagenzien zur Durchführung des ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	104
Anhang 2: Reagenzien zur Herstellung des Borrelien-Antigens	104
Anhang 3: Reagenzien zur Herstellung und Durchführung des IFT	105
Anhang 4: Reagenzien zur Durchführung des IgM- und IgG-Western-Blots	106
Anhang 5: Reagenzien zur Durchführung des IgG-Subklassen Westernblots	108
Anhang 6: Reagenzien zur nephelometrischen Bestimmung der IgG-Subklassen mit dem LD NK- Combikit (NK001).....	110
Anhang 7: Standardreagenzien des Behring Nephelometer zur nephelometrischen IgG-Subklassen Bestimmung	111
Anhang 8: Testansätze nach den Angaben von LD Labor Diagnostika	111
Anhang 9: Abkürzungen.....	116

1. Einleitung

1.1 Was versteht man unter einer Lyme Borreliose?

Die Entdeckung der Lyme Krankheit begann 1975 mit der Entdeckung einer ungewöhnlichen Häufung von Arthritiden bei Kindern aus Lyme in Connecticut, die einer juvenilen rheumatoiden Arthritis ähnelten. Diese Tatsache veranlaßte Steere et al. (1976) klinische und epidemiologische Untersuchungen durchzuführen. Diese spezielle Form der Arthritis war bislang unbekannt, sodaß sie nach dem Erstbeschreibungsort Lyme-Arthritis genannt wurde.

Da man in weiteren Beobachtungen erkannte, daß neben Gelenkaffektionen bei den betroffenen Kindern zu Teil auch Haut, Herz, und das Nervensystem betroffen waren, mußte der Name im Sinne einer Lyme-Krankheit erweitert werden (Steere et al. 1977).

Da sich die Beschwerden unter Penicillin-Therapie besserten, war ein infektiöses Agens als Ursache wahrscheinlich (Steere et al. 1980).

Bei einigen Kindern waren vor Ausbruch der Arthritis Hauteffloreszenzen beobachtet worden, die sich ringförmig ausbreiteten. Diese Hautveränderungen waren in Europa unter dem Namen Erythema chronicum migrans (ECM), das von Afzelius (1909) und Lipschütz (1913) beschrieben wurde, seit längerem bekannt. Daher nahm man an, daß beide Krankheitsbilder, in USA wie in Europa durch ein gemeinsames Agens verursacht werden.

Da die Krankheit jahreszeitlich gehäuft im Sommer beobachtet wurde und eine Häufung des ECM's nach Zeckenstichen von *Ixodes ricinus* bekannt war und da in waldreichen Gebieten die Krankheit häufiger vorkam, fiel der Verdacht auf Zecken als Vektor.

Auf der Suche nach Vektoren der Lyme-Krankheit entdeckte W. Burgdorfer et al. (1982) Spirochäten in 77 von 126 Zecken (*Ixodes dammini*, Hirschzecke). Damit hatte er erstmalig den Erreger der Lyme-Krankheit dargestellt.

In Europa wurden neben dem ECM und der Lyme-Arthritis auch andere, schon länger bekannte Krankheitsbilder, mit diesem Erreger in Verbindung gebracht, so die Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) und das Bannwarth-Syndrom, das einer lymphozytären Meningoradikulitis entspricht (Bannwarth 1944).

1.2 Klinische Verläufe der Lyme-Borreliose

Die Lyme-Borreliose bietet ein vielfältiges Krankheitsbild und wird analog zur Syphilis in drei Stadien eingeteilt. Dieser Einteilung liegt die Vorstellung zugrunde, daß die Krankheit nach einer lokalisierten Infektion im Bereich des Zeckenstichs (Stadium 1) sekundär generalisiert und Organmanifestationen an Nervensystem, Gelenken, Haut, Herz und Augen hervorruft (Stadium 2). Schreitet diese Symptomatik weiter fort und liegen mehr als 6 Monate persistierende entzündliche Veränderungen vor so wird von einem chronischen Krankheitsverlauf ausgegangen und man spricht von einer Borreliose des Stadium 3 (Duray et al. 1988).

Klinische Zeichen des ersten Erkrankungsstadiums:

Dauer: 4-6 Wochen

Haut	Erythema chronicum migrans, Lymphadenosis cutis benigna
unspezifisch	Fieber, Abgeschlagenheit
	Schmerzen von Muskel, Kopf, Hals, Gelenken, u.a.
	Lymphangitis, Lymphadenitis

Klinische Zeichen des zweiten Erkrankungsstadiums = Organmanifestation:

Dauer bis zu 6 Monaten

Nervensystem	craniale Neuritis, Meningitis
	Meningo- (/ Encephalo-/ Myelo-/ Radikulo-/ Neuritis)
	(in verschiedenen Kombinationen)
Bewegungsapparat	Myositis, Arthritis
Haut	multiple Erytheme
Herz	Endo-/ Myo-/ Perikarditis
Augen	Uveitis, Chorioretinitis
sonstige	Hepatitis

Klinische Zeichen des dritten Erkrankungsstadiums:

Dauer: Krankheitsverläufe mit progredienter Symptomatik über mehr als 6 Monaten

Nervensystem	chronisch progrediente Encephalomyelitis, Polyneuritis
Bewegungsapparat	Mono-/ Polyarthrit, chronische Polyarthrit
Haut	Acrodermatitis chronica atrophicans,
	Morphea (= umschriebene Sklerodermie)

Es zeigte sich, daß Symptome, die den Stadien 2 oder 3 zuzuordnen sind, auch ohne vorheriges Auftreten von Krankheitszeichen des Stadium 1 manifest werden können. Dies erschwert die klinische Diagnostik einer Lyme-Borreliose.

Zusätzliche Schwierigkeiten bestehen darin, daß nur wenige ausschließlich von Borrelien verursachte Krankheitsbilder existieren, zum Beispiel das ECM. Andere Krankheitsbilder, wie die Meningitis und die Arthritis können durch verschiedene Erreger hervorgerufen werden. Dies muß bei der differentialdiagnostischen Abklärung berücksichtigt werden. Zur Sicherung der Diagnose ist neben dem klinischen Bild hier die Serologie erforderlich.

1.3 Serologische Diagnostik

1.3.1 Testverfahren der Borreliendiagnostik

Zur serologischen Diagnostik der Lyme Borreliose werden folgende Verfahren eingesetzt.

1.3.1.1 Der kulturelle Erregernachweis:

Er stellt den klassischen Infektionsnachweis dar. Er ist der spezifischste Test, aber aufwendig und zudem wenig sensitiv (Goodman et al.1995). Eine Ausnahme stellt die Anzüchtung aus Liquor dar, die nach Untersuchungen von Preac-Mursic et al. (1984) in bis zu 30% der Fälle möglich ist. Aufgrund des präparativen Aufwandes und der diagnostischen Unsicherheit bei negativem Ergebnis ist dieses Vorgehen für die Routineuntersuchung ungeeignet (Steere et al. 1984). Verwendet wird er vor allem, um die Frage zu klären, ob neue, bisher nicht zur Lyme-Krankheit gehörende Symptome, von *Borrelia burgdorferi* verursacht werden oder nicht. Außerdem können neue Stämme durch die Anzüchtung des Erregers aus biotischem Material zum Beispiel bei Hautveränderungen, wie dem ECM und der ACA, gewonnen werden.

1.3.1.2 Der IFT (Immunfluoreszenz-Test):

Er dient zum Nachweis zirkulierender Antikörper, die gegen Oberflächenantigene von *Borrelia burgdorferi* gerichtet sind. Da sich ein Teil dieser Antigene auch bei anderen Bakterien findet, lassen sich oft kreuzreagierende Antikörper nachweisen (Bruckbauer et al. 1992). Diesem Problem begegnet man, indem das Patientenserum vor der Untersuchung mit Antigen von *Treponema phagedenis* versetzt wird und so kreuzreagierende Antikörper

absorbiert werden, also ein IFT mit Absorption (IFT-Abs) durchgeführt wird (Alfen et Wellensiek 1992).

Ein Anstieg der IgM-Antikörpertiter läßt sich mit dieser Methode oft nicht nachweisen, da die Antikörperkonzentrationen zu gering sind (Satz 1992). Besonders zu Beginn der Erkrankung ist die Sensitivität gering, sie steigt im Verlauf der Erkrankung und bei zunehmender Generalisierung des Krankheitsbildes an (Satz 1992). Diese Methode erfordert ein Fluoreszenzmikroskop und Erfahrung in der Auswertung der Präparate, dient aber als Screening-Test.

1.3.1.3 Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA):

Der ELISA basiert auf der Detektion von Antikörpern, damit ist er ein indirektes Nachweisverfahren. Er ist leicht durchführbar und photometrisch ablesbar. Die gegen *Borrelia burgdorferi* gerichtete Antikörperkonzentration wird bei diesem Verfahren semiquantitativ gemessen. Er dient ebenso wie der IFT-Abs zur Screening-Untersuchung größerer Patientengruppen.

Die Sensitivität des ELISA ist von der Antigenpräparation abhängig. So werden zum Beispiel Präparationen verwendet, bei denen durch Aufarbeitung der ganzen Borrelienzellen alle Antigene vorhanden sind. Diese Präparationen scheinen weniger sensitiv zu sein, da die Antigene, die stark immunogen sind, nur einen Teil des Antigenbesatzes ausmachen (Gerber et al. 1995). Andere ELISA-Formen, bei denen gentechnisch hergestellte Antigene aufgebracht werden, beinhalten zum Beispiel das Flagellin-Antigen (41-kDalton), das eine hohe Sensitivität aufweist, sehr immunogen ist und vor allem zu Beginn der Erkrankung als erstes Antigen erkannt wird. Gegenüber dem Ganz-Zell-ELISA weist dieser ELISA jedoch eine geringere Spezifität auf (Bruckbauer et al. 1992, Johnson et al. 1996).

1.3.1.4 Der Westernblot:

Mit Hilfe des Westernblots kann man borrelienspezifische IgM- und IgG-Antikörper im Patientenserum nachweisen. Der Test dient zur genaueren Bestimmung der Spezifität der Patientenantikörper in der Routinediagnostik. Der Nachweis von Antikörpern gegen ein einzelnes Antigen findet sich häufig, besonders gegen das 75-, 65-, 61-, 41-, 35-, 18-, 15- und 12-kDalton-Partialantigen da diese Antigene nicht nur bei Borrelien sondern auch bei

anderen Bakterienstämmen vorkommen (Bruckbauer et al. 1992, Fawcett et al. 1992, Magnarelli et al. 1987). Aufgrund dieser Kreuzreaktivitäten wurden kompliziertere Auswertungskriterien erstellt, die nicht nur die Anzahl der erkannten Partialantigene, sondern auch die Masse der erkannten Partialantigene und die Bandenintensität berücksichtigen.

Dieser Untersuchung liegen die Kriterien, die von Engelsing (1995) zur Diagnose einer akuten Neuroborreliose gefordert wurden, zugrunde. Sie sind in der folgenden Abbildung wiedergegeben (vergl. Abbildung 1).

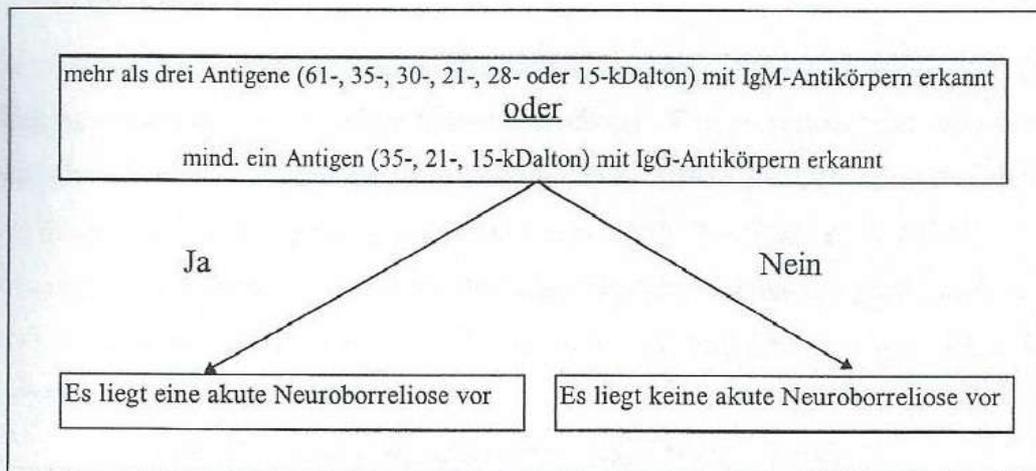


Abbildung 1: Flußdiagramm zur Beurteilung des Westernblots nach Engelsing (1995)

In der Frühphase der Erkrankung ist der Westernblot geringgradig sensitiver als der ELISA (Satz 1992). Vor allem hilft er bei der Beurteilung falsch positiver Resultate im IFT und ELISA (Carlos et al. 1990).

1.3.2 Probleme der serologischen Diagnostik

Die Diagnose einer Lyme-Borreliose ist allein aufgrund der Serologie nur sehr begrenzt möglich. Eine Neuroborreliose gilt als gesichert, wenn intrathekal die Produktion von *Borrelia* Antikörper nachgewiesen werden kann. Doch neben diesem Sonderfall, in dem die Serologie allein den diagnostischen „Beweis“ erbringen kann, finden sich in der serologischen Diagnostik in der Regel folgende Probleme.

1.3.2.1 Kreuzreaktivität:

Da ist als erstes das Problem der Kreuzreaktivität zu nennen. Einzelne Epitope des Bakteriums *Borrelia burgdorferi* sind auch bei anderen Spirochäten und Bakterien

vorhanden (Bruckbauer et al. 1992, Fawcett et al. 1992). Störende Kreuzreaktionen zeigten insbesondere Seren von Patienten mit Syphilis, Leptospirose, Pinta, Frambösie und Rückfallfieber (Alfen et al. 1992, Craft et al. 1984, Magnarelli et al. 1984, Russel et al. 1984).

Besonders der Borrelien-Immunfluoreszenz-Test ist bei Verwendung ganzer Borrelien für eine Kreuzreaktion mit Treponemen-Antikörpern anfällig (Carlsson et al. 1991) Dieser Mangel an Spezifität kann aber durch eine Absorbition des Patientenserums mit einem Antigen-Konzentrat von apathogenen Treponemen behoben werden. Zudem kann man den Westernblot als Kontrolltest verwenden.

1.3.2.2 Antigenvariabilität:

Der Vergleich serologischer Ergebnisse aus verschiedenen Laboratorien wird durch die Verwendung verschiedener Borrelien Stämme erschwert. Die einzelnen Stämme stammen aus unterschiedlichen Regionen der Welt (Wallich et al. 1993) und unterscheiden sich zum Teil erheblich in ihrem Antigenmuster(Wilske et al. 1988, Zumstein et al. 1992).

Die Erregerfamilie *Borrelia burgdorferi* (*Borrelia burgdorferi sensu lato*) wird anhand ihres Genotyps und des Proteinbesatzes in drei Unterarten: eingeteilt (Baraton et al. 1992, Lebech et al. 1994):

Borrelia burgdorferi sensu strictu (zum Beispiel: B₃₁)

Borrelia garinii (zum Beispiel: B afzelii, Stamm PKo)

Borrelia burgdorferi serovar VS 461 (zum Beispiel: Stamm Pbi)

Alle drei *Borrelia burgdorferi*-Unterarten fanden sich in europäischen Isolaten, in japanischen Isolaten fanden sich Vertreter der Gruppen *Borrelia burgdorferi sensu strictu* und *Borrelia garinii*, während Isolate aus den USA nur Borrelien der Gruppe *sensu strictu* enthielten (Baraton et al. 1992, Lebech et al. 1994).

1.3.2.3 Fehlende Aktivitätsparameter:

Die Lyme-Borreliose lässt sich, wie oben beschrieben in drei Stadien einteilen. Dabei kann die Krankheit aktiv sein, auch wenn keine IgM-Antikörper nachweisbar sind. Zum einen kann die frühe Phase der Immunantwort zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon abgeschlossen sein, zum anderen wurden Reinfektionen beschrieben, die mit einer IgG-Antikörperproduktion ohne IgM-Antikörper einhergehen (Weber et. al. 1986, Pfister et al. 1986). Zudem lassen sich IgM-Antikörper in einigen Fällen auch bei klinisch gesunden Probanden nachweisen (Engelsing 1995).

Verschärft wird dieses Problem dadurch, daß nach der Serokonversion über mehrere Monate bis Jahre positive IgG-Befunde im ELISA und im Westernblot erhoben werden können (Feder et al. 1992, Blenk et al. 1995), was die Abgrenzung von aktuell Erkrankten zu Personen mit Seronarben allein mit Methoden der Serologie unmöglich macht.

1.4 Die IgG-Subklassen: biologische Aktivität, Regulation und Nachweis

1.4.1 biologische Aktivitäten der IgG-Subklassen

Das Immunglobulin G liegt beim Menschen in vier Subklassen vor. Diese unterscheiden sich in der Form des Fc-Fragments (Hamilton 1987). Da das Fc-Fragment die biologische Aktivität des Antikörpers vermittelt, führt dieser Unterschied zu verschiedenen biologischen Wirkungen der einzelnen Subklassen.

Die biologischen Eigenschaften der Subklassen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

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

Tabelle 1: Unterschiede der biologischen Eigenschaften von IgG-Subklassen aus Roitt (1988) und Keller (1994)

Die Subklasse-IgG1 stellt, mit 60,3 - 71,5 % aller Antikörper, den größten Teil der IgG-Antikörper (Hamilton 1987). Sie wird bei Antigenkontakt früh gebildet und dominiert bei der Immunantwort gegen Proteine (Hamilton 1987). Antikörper dieser Subklasse zeichnen sich dadurch aus, daß sie Komplement auf dem klassischen Weg aktivieren können, daß sie cytophil auf Monozyten, Neutrozyten, Lymphozyten und Plättchen wirken. Damit spielen sie eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Entzündungsreaktionen. Zudem stammen die Antikörper bei allergischen Reaktionen überwiegend aus der IgG1-Subklasse

und finden sich besonders zu Beginn einer Hyposensibilisierungsbehandlung (Sondergaard et al. 1991).

Antikörper der Subklasse IgG2 stellen den zweitgrößten Anteil der zirkulierenden Antikörper dar (23%), obwohl 50% aller ruhenden B-Zellen IgG2-Antikörper auf der Oberfläche tragen und damit potentiell IgG2 sezernieren könnten (Dembeck et al. 1992). Sie können ebenfalls Komplement aktivieren, wenn auch schwächer als IgG1 und IgG3. Antikörper dieser Subklasse sind vor allem gegen Polysaccharide gerichtet (Hamilton 1987, Roitt 1988).

Der IgG3-Antikörper hat eine größere Masse als die anderen IgG-Subklassen, da die „hinge region“, das Verbindungsstück zwischen Fc-Stück und den leichten Ketten, länger ist als bei den anderen drei IgG-Subklassen (Hamilton 1987). Durch diesen Unterschied in der Struktur wird die stärkere Aktivierbarkeit des Komplementsystems durch IgG3-Antikörper erklärt (Feinstein et al. 1986). Die Halbwertszeit von IgG3-Antikörpern ist mit 7 Tagen nur ein Drittel so lang, wie bei den drei anderen Subklassen (Junker et Tilley 1994). IgG3-Antikörper besitzen wie IgG1-Antikörper cytophile Wirkung auf Monocyten, Neutrophile, Plättchen und Lymphocyten. Die Spezifität der IgG3-Antikörper entspricht der von IgG1-Antikörpern und sie sind ebenfalls gegen Proteine gerichtet.

IgG4-Antikörper stellen den kleinsten Teil der IgG-Antikörper (4%). Sie werden vor allem bei langdauernder Antigenstimulation (Mathiesen et al. 1990) und im Verlauf einer Hyposensibilisierungsbehandlung gebildet (Urbanek et Dold 1986, Peng et al. 1992). IgG4 könnte eine Rolle bei der IgE vermittelten Histaminfreisetzung spielen (Peng et al. 1992). Dabei scheint IgG4 nach einer Untersuchung von Yamakoshi et al. (1992) die Histaminfreisetzung zu verhindern oder zumindest einzuschränken. Zudem scheint nach einer Studie von Sondergaard et al. (1992) ein gemeinsamer Regulationsmechanismus für die Bildung von IgG4 und IgE zu existieren, der dazu führt, daß bei starker Produktion von IgG4 wenig IgE produziert wird, während bei starker Produktion von IgE die Produktion von IgG4 gemindert ist.

Meist lassen sich bei Immunreaktionen nur wenige spezifische IgG4-Antikörper nachweisen (Hammarstöm et Smith 1986). Jedoch stellen bei einzelnen Infektionen IgG4-Antikörper den größten Anteil, vor allem bei langdauernder Auseinandersetzung mit dem Erreger (Kollaritsch et al. 1990, Lucius et al. 1992, Aceti et al. 1993).

Die Konzentrationen der einzelnen Subklassen steigen während der ersten 15 Lebensjahre langsam an und erreichen bei Kindern erst während der Adoleszenz die eines gesunden Erwachsenen (Ziehlen et al. 1990). Aus diesem Grund wurden keine Kinder in diese Studie einbezogen.

1.4.2 Regulation der IgG-Subklassenproduktion

Im Rahmen der Erregerabwehr werden bei Infektionen spezifische Antikörper, darunter auch IgG-Subklassenantikörper, gebildet. Diese Antikörperproduktion geschieht in aktivierten B-Zellen. Dabei existieren zwei Wege der B-Zell-Aktivierung, die sich darin unterscheiden, ob die Aktivierung T-Zell-abhängig oder unabhängig erfolgt und welche Zytokine vorherrschen.

Zum einen kann die B-Zelle von einigen Antigenen, besonders größeren Antigenen direkt aktiviert werden (Subbarao et al. 1994). Diese Antigene sind meist Polysaccharide und proteinfreie Liposomen (Laman et Claasen 1996) und zeichnen sich durch einen repetitiven, das heißt sich wiederholenden, Molekülaufbau aus. Sie binden sich nicht an das MHC-II-Molekül (Harding et al. 1991), aber an membrangebundenes Immunglobulin-D, das als Rezeptor wirkt (Dintzis et al. 1976). Durch ihre Größe besetzen sie mehrere Bindungsstellen der B-Zelle und aktivieren diese. Es kommt zur Steigerung der Mitoserate der B-Zellen. Eine Antikörperproduktion erfolgt erst nach weiterer Stimulation mit einem bisher unbekanntem Agens (Laman et Claasen 1996). Anschließend produzieren diese B-Zellen IgD- und IgM-Antikörper. Durch zusätzliche Stimulation mittels Zytokine zum Beispiel Interferon- γ (IFN- γ), die von Natürlichen-Killerzellen (NK), Makrophagen, Mastzellen, T- oder B-Zellen abgegeben werden (Mond et Brunswick 1987), kommt es zum Wechsel der Antikörperklasse und zur Produktion von IgG2-Antikörpern beim Menschen und IgG3-Antikörpern bei der Maus (Stein 1992). Dieser Aktivierungsweg hat zur Folge, daß keine weitere Differenzierung der B-Zelle zur Plasmazelle oder Memory-Zelle stattfindet (Laman et Claasen 1996).

Eine zweite Gruppe von Antigenen, überwiegend Proteine, aktivieren B-Zellen in Abhängigkeit von T-Zellen (Parker 1993). Die Proteine werden von Antigen-präsentierenden-Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen oder auch B-Zellen aufgenommen, mittels Lysosomen gespalten und Teile davon auf dem MHC-Molekül der T-Zelle präsentiert (Germain et Margulies 1993). Die T-Zelle erkennt den MHC-Antigen-Komplex der präsentierenden Zelle. Falls die antigenpräsentierende Zelle keine B-Zelle war, wandert die aktivierte T-Zelle weiter, bis sie auf eine B-Zelle mit gleichem Antigen-Rezeptor-Komplex trifft. Mit dieser B-Zelle nimmt die T-Zelle über membrangebundene Adhäsionsmoleküle Zell-zu-Zell Kontakt auf (Clark et Ledbetter 1994, Noelle et al. 1992). Dieser Kontakt stimuliert die B-Zelle zur Reifung und Teilung, zudem produziert die T-Zelle Zytokine und fördert damit zusätzlich die Vermehrung und Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen und Memory-Zellen. Die aktivierten Plasmazellen produzieren Antikörper, wobei Zytokine der T-Zelle auch einen Einfluß darauf haben, welche Antikörperklasse oder Subklasse gebildet wird (Parker et al. 1996). Insgesamt herrschen bei der Aktivierung durch T-Zell-abhängige Antigene IgG1-Antikörper vor, daneben werden auch IgG2-Antikörper produziert, während IgG3 und IgG4 beim Menschen nur in geringem Umfang gebildet werden (Stein 1992).

Parallel zur Aktivierung und Differenzierung der B-Zelle zur Plasmazelle findet die Differenzierung der T-Zelle statt.

Die T-Zellen lassen sich nach ihren Oberflächenantigenen in CD4 und in CD8 positive Zellen einteilen. Dabei entsprechen erstere den T-Helfer-Zellen, während letztere die T-Suppressor-Zellen darstellen. Die T-Helfer-Zellen lassen sich in drei Untergruppen einteilen, in TH₀-Zellen, die noch nicht vollständig ausgereift sind, in TH₁-Zellen, die überwiegend Interferon- γ (IFN- γ) produzieren und in TH₂-Zellen, die überwiegend Interleukin 4 (IL-4) herstellen (Modlin 1994, Mosmann et al. 1986). Zudem fördern TH₁-Zellen mit der Ausschüttung von Interleukin 2 (IL-2) das Wachstum aller TH₁-Zellen, während die Bildung von TH₂-Zellen gehemmt wird. Demgegenüber fördern TH₂-Zellen das Wachstum aller TH₂-Zellen durch die Ausschüttung von Interleukin-4 (IL4) und hemmen damit TH₁-Zellen.

Zytokine	TH ₁ -Zelle	TH ₂ -Zelle
Interferon- γ (INF- γ)	+++	-
Tumornekrosefaktor- β (TNF β)	+++	-
Interleukin 2 (IL2)	+++	+
Interleukin 4 (IL4)	-	+++
Interleukin 5 (IL5)	-	+++

Tabelle 2: Zytokinproduktion der TH₁ und TH₂-Zellen

Es zeigte sich in der Studie von Dembech et. al. (1992), daß ein CD4⁺T-Zell-Klon nur die Produktion von einer oder zweier IgG-Subklassen induziert, daß außerdem die Stimulation der B-Zelle maximal war, wenn ein direkter Zell-zu-Zell Kontakt zwischen den B- und T-Zellen bestand. Die aktivierte B-Zelle unterliegt im folgenden der Stimulation und Regulation durch Zytokine. Als Quelle für diese Zytokine dienen, wie oben angemerkt T-Zellen, Makrophagen, Natürliche-Killerzellen, Mastzellen, eosinophile Granulozyten und auch B-Zellen selber.

Verschiedene Studien haben gezeigt, daß die Zytokine unterschiedliche Wirkungen hervorrufen. Einige fördern oder hemmen die Bildung bestimmter Antikörpersubklassen, wie die folgende Tabelle zeigt.

Zytokin	Bildungszellen	fördert Bildung von	Wachstum / Differenzierung	hemmt Bildung von
IL2	T, M, NK	-	+	IgG1 (Antagonist von IL-4) IgE (Antagonist von IL-4) Effekt unabhängig von IFN- γ
IL3	NK, eo	-	+	-
IL-4	T, M, eo, mast, NK	IgG1, IgE	+	IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM
IL-5	mast, eo	-	+	-
IL-6	B, M, NK	fördert Bildung von Plasmazellen	+	-
IL-10	M	IgM, IgG, hIgG1, hIgG3	+	-
IL-13	T	IgM, IgG _{total} , hIgE, hIgG4	-	-
IFN- γ	T, NK, M	IgG2a, IgG3 (je nach Aktivator)	+	IgG1, IgG2b, IgG3 (je nach Aktivator) IgE (Antagonist von IL-4+ IL-5)
TGF- β	T, B, M, NK	IgA, IgG2b	+	IgE
TGF- β + IL-10	T, B, M	hIgA	+	-
?		hIgG2	-	-
GM-CSF	T, NK, B	-	+	-

Tabelle 3: Interleukine Produktionsorte und Rolle in der Antikörperantwort (nach Laman et Claasen 1996)
T: T-Zelle, B: B-Zelle, M: Makrophage, NK: Natürliche-Killer-Zelle, mast: Mastzelle, eo: eosinophiler Granulozyt, h: Humaner Antikörper (nach Laman et Claasen 1996)

Für die Regulation der IgG-Subklassen ist bedeutsam, daß je nach Interleukin nicht gleichmäßig alle Subklassen vermehrt gebildet werden, sondern die Produktion einzelner Subklassen gefördert und anderer Subklassen gehemmt wird. Wie zum Beispiel bei Interleukin-4, das nur die Produktion von IgG1 fördert und die Produktion von IgG2 und IgG3 hemmt. Damit ist die Regulation der IgG-Subklassen-Produktion zum Teil eine Folge der Regulation der Zytokine.

1.4.3 IgG-Subklassen im Verlauf der Antikörperproduktion

Die Antikörperproduktion ändert sich im Verlauf einer Infektion. Als erstes werden Antikörper der Klasse IgM gebildet, die nach 14 Tagen zunehmend von Antikörpern der IgG-Klasse ersetzt werden. Aber auch der Anteil der einzelnen IgG-Subklassen verändert sich im weiteren Verlauf.

Einen Hinweis für die Veränderung der mengenmäßigen Anteile der IgG-Subklassen im Laufe der Auseinandersetzung mit einem Antigen finden sich in den Arbeiten zur Hyposensibilisierung. Hier wurde von Peng et al. (1992) beobachtet, daß IgG1 in der frühen Phase der Immuntherapie dominiert, während IgG4 erst nach längerer Behandlung in signifikanten Mengen gebildet wird.

Von Baugh et al. (1988) wurde beobachtet, daß bei primärer Syphilis vor allem IgM- und IgG1-Antikörper entstanden, während bei einer aktiven sekundäre Syphilis IgG1 (53% des Gesamt-IgG) und IgG3 (43% des Gesamt-IgG) dominierten. Demgegenüber stellten IgG2 und IgG4 nur geringe Anteile der Antikörpermenge (weniger als 10% und 2%).

In zwei Studien, in denen die IgG-Subklassenverteilung bei *Borrelia burgdorferi* untersucht wurde, fanden sich die meisten Antikörper in den Subklassen IgG1 und IgG3 (Olsson et al. 1987, Hechemy et al. 1988).

1.4.4 Nachweis der IgG-Subklassen

Die Detektion der einzelnen IgG-Subklassen erfolgt mit Hilfe der Unterschiede im Fc-Fragment, anhand derer die IgG-Subklassen zu erkennen sind. Dabei werden Antikörper eingesetzt, die jeweils gegen eine dieser Fc-Varianten gerichtet sind. Diese Detektionsantikörper sind je nach Testverfahren selbst markiert, oder werden durch

symmetrische Färbemuster erkannt. Schließlich kommt es durch die Umsetzung von Substrat zur Anfärbung.

1.5 Ziel und Fragestellung der Arbeit

In dieser Studie wurden ausgehend vom klinischen Befund zwei Gruppen von Patienten rekrutiert. Zum einen Patienten mit klinisch sicherer Borreliose zum anderen Probanden mit eher uncharakteristischen Symptomen. Die Personen beider Gruppen wiesen eine positive Borrelienserologie auf.

Das Ziel dieser Arbeit war es, serologische Hinweise für das Vorliegen einer aktiven Erkrankung zu gewinnen. Hierzu wurde untersucht, ob die Analyse der borrelienspezifischen IgG-Subklassen-Antikörper im Westernblot hilfreich sein könnte.

Besonders war von Interesse:

1. Welche Antigene in diesen beiden Gruppen von den einzelnen IgG-Subklassen erkannt wurden.
2. Ob es Unterschiede in diesen Antigenmustern gab.
3. Ob es Unterschiede in den IgG-Subklassenverteilung gab.
4. Ob Unterschiede in den IgG-Subklassenmengen auf Unterschieden in diesen Antigenmustern beruhten.

2. Material

2.1 Patientengut

Für diese Studie wurden Patienten und Probanden aus den Einsendungen des Labors für medizinische Mikrobiologie ausgewählt, die eine positive Borrelienserologie aufwiesen.

Dazu mußten folgende Einschlusskriterien erfüllt werden:

1. Der IFT-Titer mußte mehr als 1: 40 und der IFT-Abs-Titer mehr als 1: 10 betragen.
1. Der ELISA-Wert wies mehr als 200 Einheiten auf.
2. Es wurden spezifische IgM oder IgG-Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* im Westernblot nachgewiesen.
3. Bei Patienten mit Neuroborreliose wurde eine intrathekale Produktion borrelienspezifischer Antikörper nachgewiesen.
(in diesem Fall konnte der Befund im Serum auch negativ sein)

Bei allen Patienten sollte durch klinische Untersuchungen Hinweise für das Vorliegen einer früheren oder noch bestehenden Borrelien-Infektion erhoben werden. So wurde bei jedem Patienten eine neurologische Untersuchung durchgeführt. Falls dermatologische oder rheumatologische Symptome vorherrschten, wurden die Patienten in der Haut-Klinik oder der Rheumasprechstunde vorgestellt.

Durch diese Vorgehensweise konnten bei den meisten Testpersonen geklärt werden, ob zum Zeitpunkt der serologischen Untersuchung oder früher eine klinisch aktive Borreliose vorhanden war oder nicht. Bei wenigen Testpersonen war diese Zuordnung nicht möglich, sodaß sie aus der Studie ausgeschlossen wurden.

Im folgenden wurden die Testpersonen in die Gruppe der symptomatischen Borreliose-Patienten und der Probanden mit asymptomatischer Borrelien-Infektion eingeteilt. Dabei wurden die Testpersonen als Gruppe der symptomatischen Patienten zusammengefaßt, die zum Zeitpunkt der Erfassung oder anamnestisch gesichert unter den typischen Symptomen einer Borreliose, wie zum Beispiel ECM, ACA, einer Arthritis entsprechend den diagnostischen Kriterien von Steere et al. (1988), einer Meningoradikulitis entsprechend dem Bannwarth-Syndrom oder einer chronischen Neuroborreliose litten. In die Gruppe Neuroborreliosien wurden nur Patienten eingeordnet, wenn eine borrelienspezifische

intrathekale Antikörperproduktion nachweisbar war. Dabei existierten Fälle ($n = 4$), bei denen der serologische Befund im Serum negativ und nur im Liquor positiv war.

Patienten mit ECM wurden einbezogen, wenn die Effloreszenz durch eine hautärztliche Untersuchung diagnostiziert worden war. Bei einem dieser Patienten lag bei der Erstuntersuchung ein grenzwertiger Antikörpernachweis von 173 ELISA-Einheiten im Serum vor.

Die zweite Gruppe umfaßte die Testpersonen, bei denen außer einer positiven Serologie im ELISA und/oder im Westernblot, keine Hinweise für eine Borreliose zu erheben waren. Damit lag eine asymptomatische Borrelien-Infektion vor. Diese Patienten waren in der Regel, wegen nicht infektiöser Erkrankungen stationär aufgenommen worden. Während der Diagnostik waren als Zufallsbefund Antikörper gegen Borrelien aufgefallen, ohne daß die Symptome und der serologische Befund miteinander in Beziehung gebracht werden konnten.

Patienten mit aktiver Erkrankung wurden einer antibiotischen Behandlung zumeist durch intravenöse Antibiose mit Rocephin zugeführt. Ein Großteil der Patienten wurde im Rahmen der Kontrolluntersuchungen nach 6 Monaten und 12 Monaten nachuntersucht. Bei diesen Nachuntersuchungen wurde festgestellt, ob die Krankheit vollständig ausgeheilt war, ob Defektzustände bestanden, oder ob noch immer eine aktive Erkrankung vorlag, die eine erneute antibiotische Therapie zur vollständigen Ausheilung erforderlich machte.

2.2 Vorbereitung des Materials

Für die serologischen Untersuchungen wurde den Patienten bei jeder klinischen Untersuchung venöses Blut entnommen, nach vollständiger Gerinnung bei 3000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Das Serum wurde in Aliquots zu 1ml bei -18°C bis zur Weiterbearbeitung eingefroren. Vor der Wiederverwendung wurden die Proben vollständig aufgetaut, auf Zimmertemperatur gebracht und durchmischt, um eine homogene Verteilung der Antikörper zu erreichen.

3. Labormethoden

3.1 Immunfluoreszenz-Test (IFT) und IFT-Absorptions-Test (IFT-Abs)

Der IFT dient zum Nachweis von Antikörpern, die gegen Oberflächenantigene von *Borrelia burgdorferi* gerichtet sind. Im IFT-Abs werden kreuzreagierende Antikörper durch eine Absorption der Seren mit *Treponema phagedenis* Antigen absorbiert und die Spezifität so gesteigert.

Die Objektträger des Borrelien-IFT stammen aus der Herstellung des Spirochäten-Labor Prof. Dr.med. Wellensiek, Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität.

3.1.1 Reaktionsprinzip

Nach einer Absorption des Patientenserums mit *Treponema phagedenis* Antigen zur Vermeidung von Kreuzreaktionen, binden sich borrelienspezifische Antikörper an die auf Objektträgern fixierten Borrelien (Alfen 1992). In einem zweiten Schritt werden an diese Antikörper fluoreszierende Anti-Human-Antikörper gebunden. Im Fluoreszenzmikroskop induzieren diese Detektionsantikörper eine grünliche Fluoreszenz der Borrelien.

3.1.2 Herstellung des Borrelien-Antigens und der Objektträger

Alle zur Durchführung der Bakterienanzüchtung und Präparation benötigten Reagenzien sind im Anhang 2 aufgeführt. Die zur Durchführung des IFT und IFT-Abs benötigten Reagenzien sind im Anhang 3 verzeichnet.

3.1.2.1 Stammhaltung

Zur Kultivierung der Borrelien (Stamm B₃₁) wurde ein von Preac-Mursic et al. (1986) modifiziertes BKS (Barbour-Stoenner-Kelly)-Medium (Anhang 2: a) verwendet.

Die Kulturen wurden bei 32°C bebrütet und alle vier Tage mikroskopisch (Dunkelfeldpräparat) kontrolliert. Von jeder Kultur wurden alle vier Tage eine Subkultur angelegt.

3.1.2.2 Gewinnung von Antigen

100 ml einer gut bewachsenen (drei bis vier Tage alten) *Borrelia burgdorferi*-Kultur wurden in 2000 ml steriles Kelly-Medium (Anhang 2: a) eingebracht und bei 32°C bebrütet.

Nachdem das Medium ausreichend bewachsen war, nach etwa 3-4 Tagen, wurden die Bakterien mittels Zentrifugation in einer Heraeus-Zentrifuge bei 5000 rpm für 20-30 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahl-Pumpe abgesaugt und das Pellet in Borrelien-Waschpuffer (Anhang 3: a) resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt sechsmal wiederholt. Schließlich wurde das Pellet je nach Dichte in 5-10 ml Suspensionspuffer (Anhang 3: b) aufgenommen.

3.1.2.3 Herstellung der Objektträger

Zur Ermittlung der optimalen Verdünnung des Antigens wurde ein Objektträger (IFT-Objektträger der Firma BAG, Lich) mit einer Verdünnungsreihe des Antigens von 1:2, 1:4, 1:8, 1:10, 1:20 und 1:50 beschichtet, getrocknet und bis zum nächsten Tag bei 37°C im Brutschrank getrocknet. Die benötigten Objektträger (IFT-Objektträger der Firma BAG, Lich) wurden vor der Verwendung mit Methanol und sterilem bidestilliertem Wasser gereinigt.

Es folgte die Fixierung des Antigens mittels Fixier-Lösung (Anhang 3: c) für fünf Minuten, eine Spülung mit sterilem bidestilliertem Wasser für eine Minute, und die Beurteilung der Borrelien-Dichte mit dem Dunkelfeldmikroskop. Das restliche Antigen wurde entsprechend der optimalen Verdünnung mit Suspensionspuffer (Anhang 3: b) suspendiert, aliquotiert und bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.

Die einzelnen Vertiefungen der Objektträger wurden durch Tropfsaugen (die Antigen-Suspension wird aufgetropft und sofort wieder zum größten Teil abgesaugt) mit Antigen überschichtet. Der Objektträger wurde für zwei Stunden im Brutschrank bei 37°C getrocknet. Es folgte die Fixierung des Antigens, der abschließende Spülgang mit sterilem bidestilliertem Wasser und eine erneute Trocknung der Objektträger im Brutschrank bei 37°C für zwei Stunden. Der fertige IFT-Objektträger konnte bei + 8°C im Kühlschrank für etwa 4 Wochen gelagert werden.

3.1.3 Durchführung des IFT und IFT-Abs

Wenn Patientenserum wurden zwei Verdünnungsreihen angesetzt. Bei der ersten für den IFT wurde 25 µl des Serums in 100 µl PBS (Anhang 3: d), bei der zweiten für den IFT-Abs wurde die gleiche Menge Serum in 100 µl Absorptionslösung, dem *Treponema phagedenis* Antigen, (Anhang 3: e) vorverdünnt. Beide Ansätze wurden für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden parallel Verdünnungsreihen des Serums von 1: 10; 1: 40, 1: 80, 1:160, 1:320 und 1: 640 mit PBS-Lösung (Anhang 3: d) als Verdünnungsmedium hergestellt. Jeweils 10 µl der Verdünnungen wurden auf jeweils ein Feld der IFT-Objektträger aufgebracht. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit PBS (Anhang 3: d) kurz abgespült und anschließend für 5 Minuten im PBS-Bad gewaschen, danach wurden die Objektträger getrocknet.

Es wurde eine Arbeitsverdünnung der Färbeantikörper (Anhang 3: f) mit einer Konzentration von 1: 20 mit PBS hergestellt und davon 10 µl auf jedes Feld des Objektträgers aufgebracht.

Die Objektträger wurden erneut bei 37°C für eine Stunde inkubiert, anschließend, wie oben beschrieben gewaschen und getrocknet.

In diesem Zustand wurden die Objektträger innerhalb von 2 Stunden unter dem Mikroskop ausgewertet.

3.1.4 Beurteilung des IFT

Wenn im Serum Antikörper gegen Oberflächenantigene von *Borrelia burgdorferi* vorhanden waren, entstand durch die Markierung eine sichtbare Fluoreszenz. Der Test wurde als positiv gewertet, wenn im IFT oder im IFT-Abs bei der Verdünnung der Seren von 1:10 eine Fluoreszenz unter dem Mikroskop zu beobachten war. War im Serum des Patienten eine hohe Konzentration an Antikörpern vorhanden, so konnte je nachdem auch bei einer Verdünnung der Seren auf 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 oder 1:640 eine Fluoreszenz beobachtet werden. Die Verdünnung bei der gerade noch eine Fluoreszenz nachweisbar war, wurde als Titerstufe des Patienten angegeben.

3.2 Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA dient als leicht durchführbarer und photometrisch ablesbarer Test zur Screening Untersuchung der Seren. Es werden Antikörper gegen alle vorhandenen Borrelienepitope erfäßt. Eine Differenzierung der Antikörper nach dem jeweiligen Antigen ist mit dieser Methode nicht möglich.

Der in dieser Studie verwendete ELISA-Kit stammt von der Firma Sigma, Diagnostics, St. Louis, USA (1990) und wurde entsprechend der von der Firma angegebenen Anleitung durchgeführt. Er diente zum Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* in den Klassen IgM und IgG.

3.2.1 Reaktionsprinzip

Das Prinzip des ELISA basiert auf der Antigen-Antikörper Reaktion im Sinne eines Enzymimmunoassay, durch die mittels Sandwich-Technik gegen den Erreger gerichtete Patienten-Antikörper nachgewiesen wurden.

An die Wände der Mikrotitergefäße war lösliches Antigen (Zellsonikat) des *Borrelia burgdorferi* Stammes B31 gebunden, das zunächst mit dem Patientenserum reagiert. Nach einem Spülvorgang wurden an die Patientenantikörper enzymmarkierte gegen humanes IgM und IgG gerichtete Detektionsantikörper gebunden. Durch die enzymatische Reaktion der Detektionsantikörper mit Substrat wurde das Vorhandensein der Patientenantikörper sichtbar gemacht.

Je mehr spezifische Antikörper der Klassen IgM beziehungsweise IgG im Serum enthalten sind, desto intensiver war die erzeugte Färbung. Diese Färbungsintensität wurde durch photometrische Bestimmung der Absorption bei 405 nm bestimmt. Als Ergebnis erhielt man die relative Menge an Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* B31.

3.2.2 Durchführung

Die für die Durchführung benötigten Reagenzien sind im Anhang 1 aufgeführt.

Zur Testvorbereitung wurde in beschrifteten Röhren 5 µl Patientenserum (Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml Nr. 3810) und jeweils 500 µl Verdünnungsmedium (Anhang 1: a) gegeben. Diese so 1:100 verdünnten Proben wurden auf einem Schüttelgerät (Heidolph, Typ Reax I) gemischt. Bei jeder Testreihe erfolgt die Mitführung dreier Positiv- (Anhang 1:b), dreier Labor- (Anhang 1: c) und zweier Negativkontrollen (Anhang 1: d). Die Mikrotiterplatte (Anhang 1: e) wurde mit jeweils 100 µl der 1:100 verdünnten Probe pro

Vertiefung und in einer eigenen Vertiefung mit 100 µl Verdünnungsmedium für den Leerwert bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Die Kavitäten werden anschließend geleert und mit je 300 µl Waschpuffer (Anhang 1: f) dreimal wiederholt gewaschen. Nach der letzten Leerung wurden alle Mikrotitergefäße mit 100 µl des alkalische Phosphatase markierten Detektionsantikörpers (Anhang 1: g) bei Raumtemperatur für weitere 15 Minuten inkubiert. Es folgte erneut eine dreimalige Waschung der Kavitäten. Im nächsten Schritt wurde 100 µl Natrium-p-Nitrophenylphosphat als Substrat (Anhang 1: h) pro Gefäß eingefüllt. Die alkalische Phosphatase des Detektionsantikörpers setzte das Substrat um, so daß es zu einer Färbung kam. Diese Reaktion wurde nach 15 Minuten bei Raumtemperatur durch die Zugabe von 100 µl Stopplösung (Anhang 1: i) abgebrochen. Die entstandene Färbung wurde als optische Dichte im Bio-Tek Mikroplate Photometer (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA) innerhalb einer Stunde bei 405 nm (Referenzwellenlänge 603 nm) gemessen.

3.2.3 Beurteilung

Für alle Seren wurde die Gesamtkonzentration der IgM- und IgG-Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* wie folgt berechnet:

Um Tagesschwankungen auszugleichen, wurde aus der Dreifachbestimmung der Extinktionswerte für die Laborkontrolle der arithmetische Mittelwert (M) ermittelt. Die Antikörperkonzentration der Laborkontrolle war mit 1539 Einheiten (E) definiert. Die Extinktion einer Probenverdünnung von 1:100, die 13% des arithmetischen Mittelwertes der Labor-Kontrollen-Extinktionswerte entspricht, wurde 200 E definiert.

Berechnung der Konzentration in Einheiten (E) an Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi*:

$$\text{Antikörper-Konzentration (E)} = \frac{\text{Extinktion der Probe} \times 1539 \text{ E}}{\text{M (Extinktion der Laborkontrolle)}}$$

Abbildung 2: Formel zur Berechnung der ELISA-Titer aus der photometrisch gemessenen Extinktion

Als positiv wurden Seren mit mehr als 200 Einheiten gewertet, während Seren mit weniger als 150 Einheiten als negativ und Seren mit mehr als 150 und weniger als 200 Einheiten als grenzwertig gewertet wurden.

3.3 Borrelienspezifischer Immunoblot zum IgM- und IgG-Nachweis

3.3.1 Herstellung des Westernblots

3.3.1.1 Herstellung des Borrelien-Antigens

Das Borrelien-Antigen wurde wie oben unter Punkt 3.2 beschrieben angezchtet. Nach fünf Tagen wurde die Bewuchsdichte kontrolliert (Dunkelfeldpräparat), war sie nicht ausreichend, so wurde das Medium einen weiteren Tag bebrütet, andernfalls wurden die Borrelien in einer Heraeus-Zentrifuge sedimentiert (20 000 G, 20 Minuten, 4°C) und dreimal mit Waschpuffer (Anhang 2: b) gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die gewaschenen Borrelien auf das 100-fache des Ausgangsvolumens konzentriert. Der Proteingehalt der Borrelien-Suspension wurde bestimmt (die Methode wird im folgenden Abschnitt beschrieben) und mit Waschpuffer (Anhang 2: b) auf eine Konzentration von 1 mg / ml eingestellt.

Zu 10 ml dieser Antigen-Suspension wurden 1500µl der Solubilisierungs-Lösung (Anhang 2: c) gegeben. Die Proteine wurden dann durch Erhitzen für 10 Minuten auf 100°C im kochenden Wasserbad solubilisiert. Anschließend wurde das Antigen aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.3.1.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der *Borrelia burgdorferi*-Suspension wurde das BCA (Bicinchoninic Acid) Protein-Test-Reagenz der Firma Pierce (Rockford, IL USA) verwendet. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde eine Proteinstandardreihe mit bekannten Konzentrationen von 0,2 mg / ml bis 2,0 mg / ml BSA (Bovine serum albumin = Rinderserumalbumin) vorgelegt.

Von der zu untersuchenden Probe wurde eine Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:32 hergestellt. Der Test wird in einem Mikroansatz durchgeführt, dabei wurden 10 µl Probe mit 100 µl BCA-Lösung gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Es entwickelte sich eine Gelb-Färbung der Probe, deren Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 562nm gemessen und mit der Eichkurve verglichen wurde. Aus dem Vergleich erhielt man die Proteinkonzentration der Probe (Pierce 1989).

3.3.2 Reaktionsprinzip

Das Prinzip der SDS-PAGE beruht auf der Trennung eines Antigengemisches in einem Polyacrylamid-Gels in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (= Sodiumdodecylsulfat = SDS) mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Die so nach ihrem Molekulargewicht getrennten Proteine wurden auf eine Transfermembran übertragen („geblottet“) und standen damit zur Reaktion mit spezifischen Antikörpern des Patienten zur Verfügung. Streifen der Transfermembran wurden mit Verdünnung des Patientenserums inkubiert. Die spezifischen Patientenantikörper banden sich an das Antigen. In einem zweiten Schritt lagerten sich mit Enzymen markierte Detektionsantikörper vom Kaninchen an die humanen Primärantikörper der Patienten an. Durch die Zugabe der entsprechenden Substrate wurde eine Anfärbung im Bereich des erkannten Partialantigens erreicht, die auch als Bande bezeichnet wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden so mit jeweils spezifischen Detektionsantikörpern Färbungen der Patienten-IgM-, -IgG- und der -IgG-Subklassen-Antikörpern hergestellt. Im folgenden wird die Durchführung des IgM- und IgG-Blots beschrieben, die Beschreibung der IgG-Subklassen-Blots folgt unter dem Punkt 5.1.

3.3.3 Durchführung des Westernblots

3.3.3.1 Durchführung der SDS-PAGE

Der Westernblot wurde nach der von Towbin et al.(1979) angegebenen Methode (modifiziert von Bhakdi et al. (1984)) durchgeführt. Hierbei wurden die Antigene durch eine Natrium-Dodecyl-Sulfat- Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) in einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Lämmli (1970) aufgetrennt. Es wurden homogene 15%-ige Polyacryamidgele verwendet. Die Sammelgelkonzentration betrug 5%.

Die zur Durchführung des Immunoblots benötigten Reagenzien sind im Anhang aufgeführt (vergleiche Anhang 4). Die SDS-PAGE wurde in einer Apparatur der Firma Desaga (Desaphor VA) durchgeführt. Zwischen zwei Glasplatten, deren Zwischenraum durch 1,5 mm dicke Kunststoffstreifen als Abstandhalter zu den Seiten und nach unten durch Aufpressen auf eine Kautschukfläche flüssigkeitsdicht abgeschlossen war, wurde ein 15%-iges Trenngel (Anhang 4: a) gegossen und mit 1 ml sterilem Wasser überdeckt. Nach

Nach der Polymerisierung wurde das Wasser entfernt und das Trenngel 15 mm hoch mit einem 5%igem Sammelgel (Anhang 4: b) überschichtet und dieses wiederum mit 1 ml sterilem Wasser abgedeckt. Nach erneuter Polymerisation wurden die Glasplatten mit dem Gel zwischen die zwei mit Laufpuffer (Anhang 4: d, e) gefüllten Behältnisse der Apparatur eingespannt, sodaß Ober- und Unterkante jeweils mit den Puffern in Verbindung standen.

Die Borrelienantigen-

Präparation des B₃₁-Stammes

wurde aufgetaut, kurz im

Wasserbad zum Kochen

gebracht und anschließend mit

drei Tropfen 1% Bromphenol-

blau (Anhang 4: f) versetzt.

Nach dem Einspannen der

Platten wurde jeweils 1ml der

Borrelienantigen-Präparation des

B₃₁-Stammes auf ein Sammelgel

aufgetragen (siehe Abbildung 3).

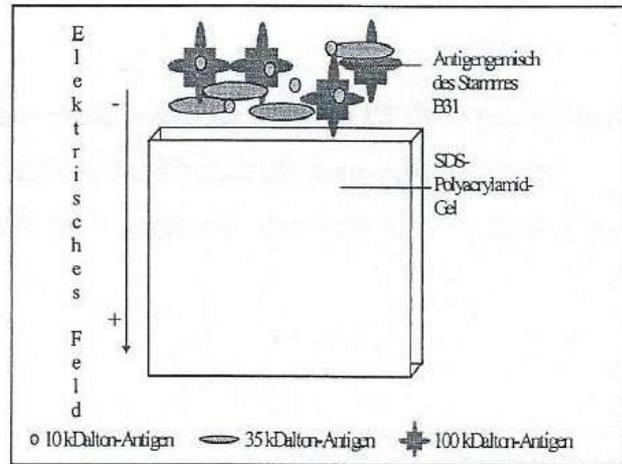


Abbildung 3: Auftrennung des Antigengemisches im SDS-Polyacrylamid-Gel

Bei einem Stromfluß von konstant 20 mA wurde an das Gel für etwa 15 Stunden eine

Gleichspannung angelegt, bis

sich die durch das Bromphenol-

blau sichtbare Front der

Suspension ca. 1 cm oberhalb des

unteren Gel-Randes befand.

Das Gel wurde vorsichtig aus der

Laufvorrichtung entnommen.

Zur Kontrolle der Elektrophorese

und damit der Verteilung der

Partialantigene im Gel wurden

jeweils die Randstreifen von ca.

2 cm Breite abgeschnitten und

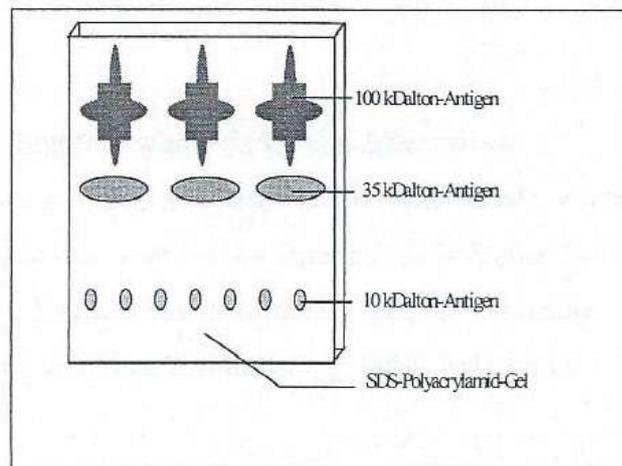


Abbildung 4: Antigenverteilung im Gel nach der Elektrophorese

zunächst 1 Stunde in Coomassie-Blau-Färbelösung (Anhang 4: g) gefärbt, dann 1 Stunde mit Entfärbemittel (Anhang 4: k) behandelt und schließlich über Nacht in 10%-iger Essigsäure fixiert. Diese Streifen wurden zur Dokumentation in Folie eingeschweißt (siehe Abbildung 4).

Für den Transfer der *Borrelia burgdorferi* Partialantigene auf eine PVDF-Transfermembran (Polyvinylidendifluorid-Mikroporus Membran der Firma Millipore, eingetragenes Warenzeichen: Immobilon PVDF) wurde die Vorgehensweise nach Kyhse-Andersen (1984) angewendet.

Zur Vorbereitung wurde die Transfermembran 5 Minuten in 100% Methanol eingeweicht, danach mit sterilem Wasser für 10 Minuten gewaschen und auf einer Lage in Blot-Puffer (Anhang 4: h) eingeweichter Filterpapiere luftblasenfrei aufgelegt. Darauf deckte man, ebenfalls ohne Luftblasen, das Gel und schließlich eine weitere Lage in Blot-Puffer (Anhang 4: h) eingeweichter Filterpapiere.

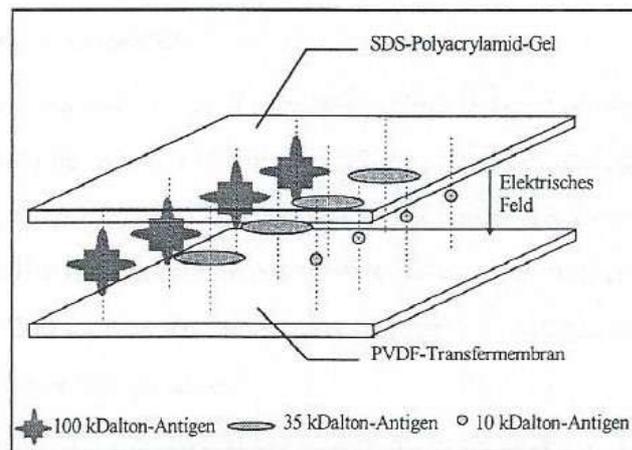


Abbildung 5: Bloten des Antigens auf eine PVDF-Transfermembran

Bei dem Blotvorgang (engl.: to blot = abtupfen) wurde durch eine transversale Elektrophorese das Antigen aus dem Gel auf die Transfermembran transportiert, wo es fixiert wurde. Dieser Arbeitsschritt wurde mit einer Blotkammer (LBK Bromma 2117 Multiphor) ausgeführt, an der über zwei Stunden eine Spannung von 250 Volt anlag. Nach dem Proteintransfer wurde das Gel wie oben beschrieben gefärbt, fixiert und eingeschweißt.

3.3.3.2 Kontrolle des Blots

Die Transfermembran wurde anschließend zur Neutralisation des pH's in PBS (Anhang 4: i) über 30 Minuten auf einem Rüttler (Certomat R Typ 886302/4 Braun) geschwenkt. Zur Erfolgskontrolle wurden etwa 1,5 cm breite Randstreifen von der Transfermembran abgeschnitten und mit Amidoschwarz gefärbt, um die übertragenen Proteinbanden sichtbar zu machen. Dieser Färbeprozess wurde durch 20 minütiges Einlegen der Streifen in Entfärbler (Anhang 4: k) beendet, dabei wurde nichtgebundene Farbe wieder von der Transfermembran gelöst. Der Rest der Transfermembran wurde zwischen Filtern getrocknet, beschriftet und eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierlösung (Anhang 4: l) gelegt, anschließend wieder getrocknet und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

3.3.3.3 Inkubation des Blots mit Patientenserum

Für die weiteren Schritte wurde der Gesamtblot in ca. 3 mm breite Streifen geschnitten und jeweils ein Streifen pro Reaktionswanne mit den Maßen 5 x 120 x 20 mm eingelegt. Zur Absorption kreuzreagierender Antikörper gegen Partialantigene, die außer bei *Borrelia burgdorferi* bei allen Bakterien der Familie der Spirochaetaceae vorhanden sind, wurden 50 μl der zu untersuchenden Seren mit 200 μl Absorptionslösung (Anhang 4: o) über einen Zeitraum von einer Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dieser Absorption wurden das vorbereitete Serum mit Blockierlösung (Anhang 4: l) zur Endkonzentration von 1:100 aufgefüllt, auf die Streifen gegeben und über Nacht auf einem Rüttler (s.o.) bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde die Serumverdünnung dekantiert und die Streifen zweimal 20 Minuten in jeweils 2 ml Blot-Waschlösung (Anhang 4: m) gewaschen, um nichtgebundenes Material abzuspielen. Nach diesem Schritt entspricht der Blotaufbau der Abbildung 6.

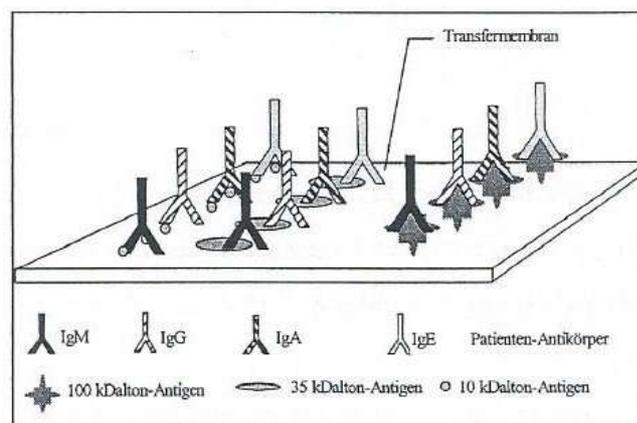


Abbildung 6: Inkubation des Blots mit Patientenseren

3.3.3.4 Inkubation des Blots mit Detektionsantikörpern für IgM und IgG

Als nächstes wurde in 1 ml Blockierlösung mit der Konzentration 1:1000 der jeweilige Detektionsantikörper für Humanes IgM und -IgG (Anhang 4: p, q, S. 110) für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es schloß sich ein weiterer Waschvorgang, wie oben beschrieben, an. (vergleiche Abbildung 7)

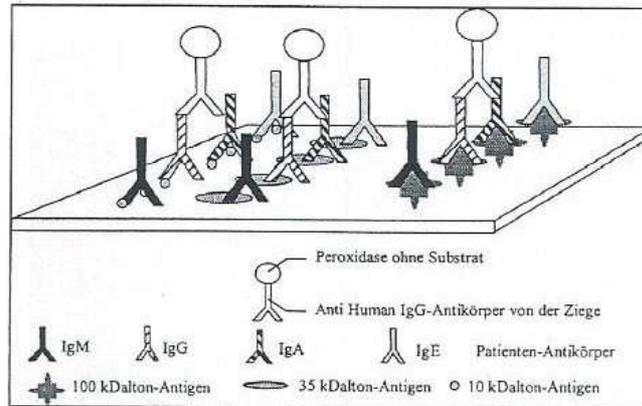


Abbildung 7: Inkubation des Blots mit peroxidase-markierten Detektionsantikörper für humanes IgG

Die Streifen wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur in Entwickler (Anhang 4: n, S.109) gelegt, sodaß durch die enzymatischen Umwandlung des Substrates die Banden sichtbar wurden. Nach anschließendem Abspülen mit destilliertem Wasser wurden die Streifen getrocknet, sortiert und für die Auswertung in der ursprünglichen Form als Blot aufgeklebt.

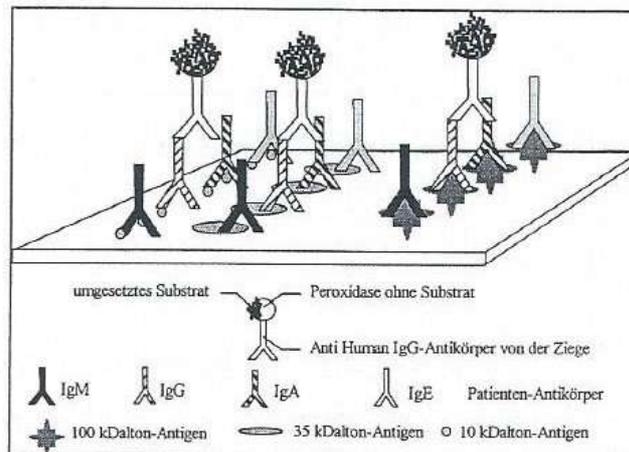


Abbildung 8: Färben der Detektionsantikörper durch Zugabe des Substrates

3.3.4 Beurteilung der IgM-/ IgG-Streifen

Die Bestimmung der Molekulargewichte der Partialantigene erfolgte durch den Vergleich der Laufweite der Partialantigene mit standardisierten Proteinmarkern (Anhang 4: c), die in einer separaten Aussparung im Sammelgel parallel zu dem Borrelien Antigen aufgetrennt wurden.

Die Anfärbung erfolgte zum einen mit Amidoschwarz nach der oben beschriebenen Methode. Zusätzlich wurden Streifen des gleichen Blots mit Serum eines hochpositiven Patienten inkubiert. Auf diese Weise war es möglich die von diesem Kontroll-Patienten

erkannten Banden durch Vergleich mit den Proteinmarkern eindeutig zu bestimmen (Abbildung 9).

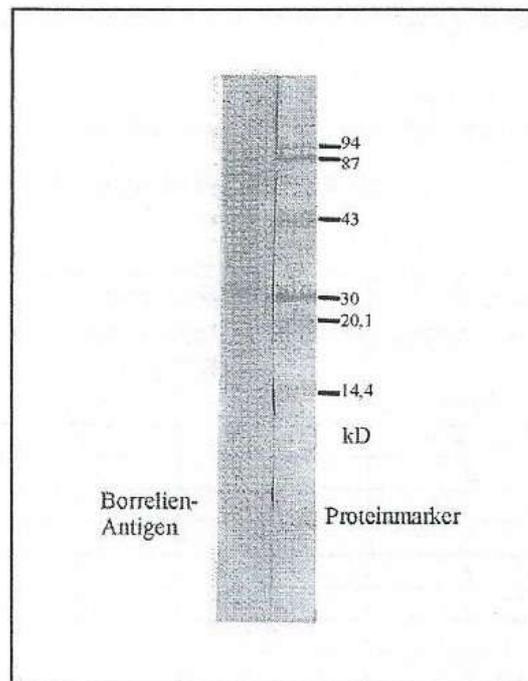


Abbildung 9: Bestimmung der Partialantigene von *Borrelia burgdorferi* mit Proteinmarkern

In der Folge wurde bei jedem *Borrelia burgdorferi* Immunoblot zusätzlich dieses Kontrollserum untersucht und ausgewertet, wodurch einerseits durch die Inter-Assay-Kontrolle eine Qualitätskontrolle der SDS-PAGE gegeben war und zusätzlich die Banden eines neuen Patienten durch Vergleich mit dem Bandenmuster des Kontroll-Patienten identifiziert werden konnten.

Der Westernblot wurde entsprechend der Untersuchung von Engelsing (1993) ausgewertet. Dabei wurden für IgM-Antikörper folgende Antigene betrachtet: 61-, 35-, 31-, 21-, 18- und 15-kDalton und für IgG-Antikörper das 35-, 21- und 15-kDalton Antigen. Als positiv wurde der Test gewertet, wenn mindestens vier der IgM-Banden, genau diese drei IgG-Banden oder drei der IgM-Banden und zwei der IgG-Banden vorhanden waren.

3.3.5 Darstellung der Immunoblot-Ergebnisse

Im folgenden wird die Transformation der Rohdaten in die verwendete graphische Darstellungsform am Beispiel der Ergebnisse der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1 vorgestellt.

In Tabelle 4 ist dargestellt wie oft die einzelnen Partialantigene von *Borrelia burgdorferi* mit IgM- beziehungsweise IgG-Antikörper erkannt wurden.

<i>Bandenk Dalton</i>	<i>Patienten bei der Erstuntersuchung n = 8</i>		<i>Patienten bei der ersten Nachuntersuchung n = 7</i>	
	<i>IgM</i>	<i>IgG</i>	<i>IgM</i>	<i>IgG</i>
<i>100</i>	4	4	2	1
<i>75</i>	3	5	2	6
<i>65</i>	6	8	2	6
<i>61</i>	3	4	2	5
<i>41</i>	7	8	5	6
<i>35</i>	3	5	2	5
<i>31</i>	2	6	1	5
<i>21</i>	3	5	2	3
<i>18</i>	3	6	1	2
<i>15</i>	0	4	0	2
<i>12</i>	1	4	0	4
<i><10</i>	0	0	0	2

Tabelle 4: Anzahl der Patienten, die einzelne Partialantigene erkannten

Um diese Einzeldaten übersichtlicher zu machen, wurden diese Daten in den folgenden Diagrammen so klassiert, daß die Stärke der Graufärbung im Feld eines Partialantigens der Häufigkeit dieser Bande im jeweiligen Patientenkollektiv entspricht.

Dabei steht: -ein weißes Feld für ein Partialantigen, das von keinem Patienten erkannt wurde,

-ein hellgraues Feld für ein Partialantigen, das von bis zu einem Drittel der Patienten erkannt wurde,

-ein dunkelgraues Feld für ein Partialantigen, das von bis zu zwei Dritteln der Patienten erkannt wurde und

-ein schwarzes Feld für ein Partialantigen, das von allen Patienten erkannt wurde.

In der Abbildung 10 sind die Ergebnisse aus Tabelle 4 in der oben angegebenen Weise aufbereitet.

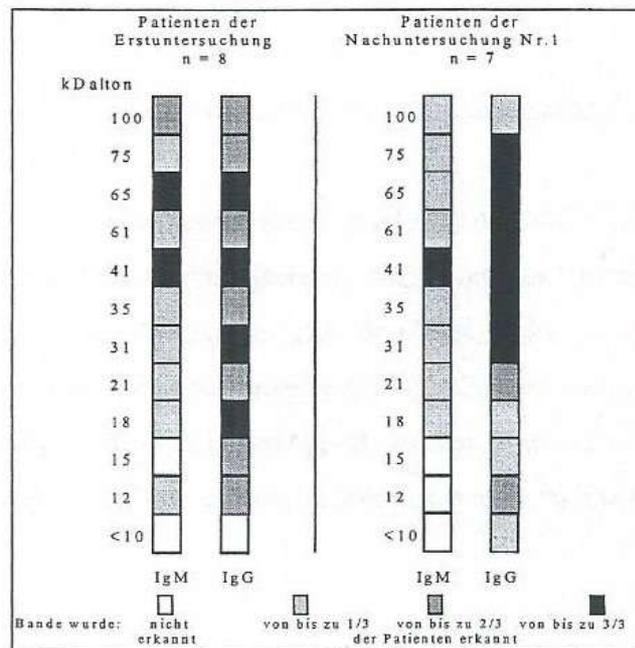


Abbildung 10: IgM- und IgG-Westernblotergebnisse der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1

3.4 Quantitative Bestimmung der Gesamt-IgG-Subklassenmenge mit Hilfe der Nephelometrie

Die quantitative Bestimmung der Gesamt IgG-Subklassen wurde mittels des Nephelometrie-Kombikit von LD Labor Diagnostika, hergestellt von the binding Site, Birmingham, Großbritannien (Bestellnummer NK001) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Diese Methode diente der Kontrolle, daß die IgG-Subklassen-Verteilung in der symptomatischen und der asymptomatischen Patientengruppe gleich war, um auszuschließen, daß Unterschiede in der Verteilung der spezifischen IgG-Subklassen auf Unterschieden der Verteilung der IgG-Subklassen insgesamt beruhten.

3.4.1 Reaktionsprinzip

Die Nephelometrie beruht auf der Trübung der Reaktionslösung durch Immunkomplexe, die bei der Bindung der Detektionsantikörper an die Patientenantikörper entstehen.

Je höher der Gehalt des Patientenserums an einer bestimmten Antikörperklasse ist, desto mehr Immunkomplexe werden gebildet und desto größer ist die Lichtbrechung. Dieser Streueffekt bewirkt eine Ablenkung des Lichtes in die Fotodiode eines optischen

Linsensystems, sodaß die Intensität des Streulichtes direkt proportional zum Antikörpergehalt der Probe ist.

3.4.2 Durchführung

Die für die Nephelometrie verwendeten Reagenzien sind im Anhang aufgeführt (vgl. Anhang 6 und 7).

Vor der Durchführung des Testes wurde das Testschema des NK-Combikit von LD im Hauptmenü des Nephelometrie-Gerätes Behring Nephelometer 100 installiert. Es beinhaltet die Mischungsverhältnisse der Reagenzien und die nötigen Inkubationszeiten für die Bestimmung einer Subklasse beziehungsweise der IgG-Gesamtmenge und umfaßt fünf einzelne Testansätze, die als Testprofil gekoppelt wurden. Dieses Bearbeitungsprogramm ist vom Hersteller vorgegeben und im Anhang aufgeführt (vergl. Anhang 8).

3.4.2.1 Kalibration

Zur Erstellung der Eichkurven erfolgte die Kalibration mittels des mitgelieferten Kalibrators (Anhang 6: f) mit bekannter Konzentration der IgG-Gesamtmenge und der IgG-Subklassen. Der Ablauf der Kalibration war im Programm des Gerätes vorgegeben. War die Kalibration erfolgreich, das heißt, wick die Eichkurve an keinem Meßpunkt mehr als 10% vom vorgegebenen Wert ab, konnte die Analyse des Probenmaterials erfolgen.

3.4.2.2 Testdurchführung

Von den verwendeten Proben wurde, nachdem sie aufgetaut und ausreichend durchmischt waren, 500µl in die vorgesehenen Probengefäße des Gerätes eingebracht. Die Reagenzien und Seren wurden in die jeweiligen Einstellplätze eingestellt. Nach der Erstellung der Arbeitsliste und der Bestückung des Analysators mit Serum und Reagenzien führte das Gerät die Analyse durch.

3.4.2.3 Beurteilung

Von den ermittelten Trübungen wurde automatische der Küvettenleerwert abgezogen. Manuell mußte noch der Probenleerwert abgezogen werden, der die Ausgangstrübung der Seren ohne Reagenzien beinhaltet. Als Endwert erhielt man die Konzentration für das Gesamt-IgG und der einzelnen IgG-Subklassen.

4. statistische Auswertung

4.1 Methoden

Für die statistische Untersuchung wurden folgende Methoden verwendet:

- Chi-Quadrat-Anpassungstest
- Wilcoxon-Test
- t-Test für unverbundene Stichproben
- Vierfelder-Test (mit Yates-Korrektur)
- Fisher-Test

Das Signifikanzniveau für Signifikanztests wurde auf $p = 0,05$ festgelegt.

Detaillierte Informationen zu den verwendeten Tests sind der angegebenen Literatur zu entnehmen (Claus et al. 1982, Hartung et al. 1985).

4.2 Box- und Whisker-Plots

In der Medizin erhobene Datenmengen werden gewöhnlich mit der Einzeichnung des arithmetischen Mittelwertes und der dazugehörigen Standardabweichung (oder mit dem Standardfehler des Mittelwertes), abgetragen als Intervalle nach beiden Seiten, graphisch präsentiert.

Diese Darstellungsart besitzt besonders bei nicht-normal verteilten Datenmengen eine eingeschränkte Aussagekraft, da wichtige Detailinformationen unerwähnt bleiben. Eine geeignetere Alternative bietet der Box- und Whisker-Plot. Er ist als Darstellungsform aus dem Punktdiagramm abgeleitet und zeichnet sich durch starke Komprimierung der Daten mit hohem Informationsgehalt in Bezug auf schiefe Verteilungen und Ausreißer aus. Die Vorteile wurden von Dietlein und Gammel (1982) demonstriert.

Zum Vergleich sind sowohl die Punktwolke als auch der Box- und Whisker-Plot in Abbildung 11 dargestellt.

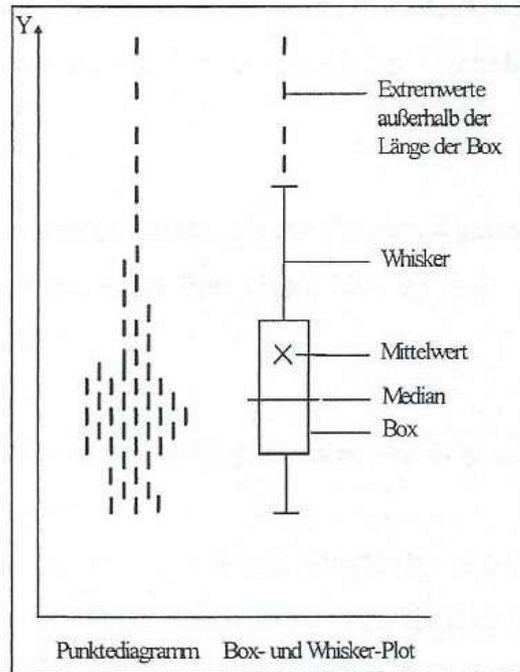


Abbildung 11: Punktediagramm im Vergleich mit dem entsprechenden Box- und Whisker-Plot

Die Box wird als Rechteck so eingezeichnet, daß genau 25% der Datenmenge darüber und ebenfalls 25% darunter liegen. Damit umfaßt die Box 50% der Daten, nämlich den mittleren Anteil davon. Der Median wird als horizontale Linie, der Mittelwert als Kreuz eingezeichnet. Diese direkte Kennzeichnung erlaubt es, sich durch die Differenz dieser beiden Werte einen ungefähren Eindruck von der Schiefe der Verteilung zu schaffen. Der Whisker entsteht dadurch, daß die Länge der Box zusätzlich als Intervall oberhalb und unterhalb der Box abgegriffen wird.

Anders verhält es sich, wenn eine schiefe Verteilung der Werte vorliegt. In diesem Fall reicht der Whisker nur bis zum letzten Einzelwert, der in dem Intervall liegt, das der Box-Länge entspricht, dabei kann der Whisker auch kürzer als die Länge der Box sein (siehe in Abbildung 11 unterer Whisker).

Liegen einzelne Werte außerhalb des Bereiches, der der Box-Länge, also dem Whisker, entspricht, so werden sie einzeln als kurze Striche aufgeführt (siehe in Abbildung 11 oberhalb der Box und außerhalb des Whiskers).

4.3 Darstellung der statistischen Auswertung der Immunoblots

Das zentrale Merkmal, das in dieser Studie untersucht wird, ist die Häufigkeit, mit der ein Partialantigen in einer Patientengruppe erkannt wird. Die Darstellung der Ergebnisse für eine Gruppe ist oben (S.32) beschrieben.

Es wurden symptomatische und asymptomatische Patienten getrennt für jedes Partialantigen (100- bis 12-kDalton) und jeden Antikörper (IgM, IgG, IgG1-4) mit Hilfe eines Fisher-Tests ($p < 0,05$) miteinander verglichen.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung wurden, wie folgt dargestellt (Abbildung 12).

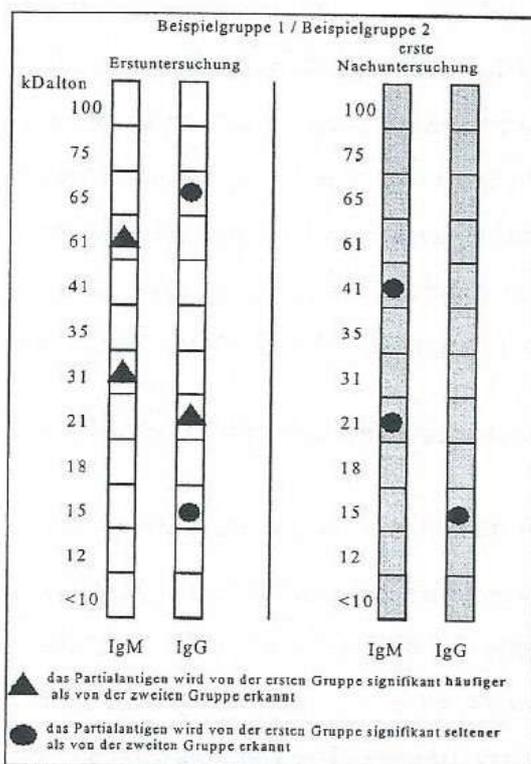


Abbildung 12: Darstellung der statistischen Auswertung der Immunoblots

Beim Vergleich der Beispielgruppen werden mehrere signifikante Unterschiede dargestellt. Dabei steht das Dreieck in dem Feld des Partialantigens, das von der ersten Gruppe signifikant häufiger erkannt wurde. Im Beispiel wurden bei der Erstuntersuchung das 61- und 31-k Dalton-Partialantigen signifikant häufiger von Patienten der Beispielgruppe 1 mit IgM-Antikörpern erkannt, während das 21-k Dalton-Partialantigen von Patienten der Beispielgruppe 1 signifikant häufiger mit IgG-Antikörpern erkannt wurde.

Der Kreis steht im Feld des Partialantigens, das von den Patienten der ersten Gruppe signifikant seltener erkannt wurde. So wurde im Beispiel bei der Erstuntersuchung das 65- und 15-k Dalton-Partialantigen signifikant seltener von Patienten

der Beispielgruppe 1 mit IgG-Antikörpern erkannt, während bei der ersten Nachuntersuchung das 41- und 21-k Dalton-Partialantigen signifikant seltener mit IgM-Antikörpern und das 15-k Dalton-Partialantigen signifikant seltener mit IgG-Antikörpern erkannt wurde.

5. Ergebnisse

5.1 Qualitative Analyse der IgG-Subklassen im Westernblot

Mit den bisherigen Methoden, die für die Borrelienserologie verwendet werden, konnte nur differenziert werden, ob gegen *Borrelia burgdorferi* gerichtete Antikörper der Klassen IgM- und IgG vorlagen. Eine Differenzierung der IgG-Subklassen im Westernblot wurde bisher nicht durchgeführt.

5.1.1 Reaktionsprinzip

Das Reaktionsprinzip des IgG-Subklassen-Westernblots entspricht dem Westernblot zum Nachweis von Patienten-IgM- oder IgG-Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* (vergleiche 3.3.2). Dabei binden die Antikörper des Patienten an die durch eine SDS-PAGE aufgetrennten und auf einer Transfermembran fixierten Borrelien-Partialantigene. An die Patientenantikörper binden sich für jede IgG-Subklasse spezifische monoklonale Detektionsantikörper. Die Detektionsantikörper werden von enzymmarkierten Färbeantikörpern erkannt. Durch die enzymatische Umsetzung von entsprechendem Substrat wird die jeweilige Bandenfärbung erreicht.

5.1.2 Vorbereitung des IgG-Subklassenblots

5.1.2.1 Bestimmung der optimalen Antigenkonzentration

Die für die Durchführung des Tests benötigten Reagenzien sind im Anhang 4 und 5 aufgeführt. Die verwendeten Geräte entsprechen den Geräten bei der Herstellung und Durchführung des IgM / IgG-Blot Abschnitt 3.3.

Für die IgG-Subklassen-Detektion wurde nach der oben beschriebenen Methode ein Westernblot mit *Borrelia burgdorferi* B₃₁ Antigen auf einer Transfermembran hergestellt (vergleiche 3.3.1 und 3.3.3).

Da Antikörper der IgG4-Subklasse im Serum nur in geringer Konzentration vorliegen, wurde in dieser Arbeit zunächst versucht die Sensitivität des Immunoblots zu steigern, um auch spezifische, gegen *Borrelia burgdorferi* gerichteten Antikörper dieser Subklasse nachweisen zu können. Dazu wurde der oben beschriebene Borrelien-Westernblot als -spezieller IgG-Subklassen-Blot modifiziert.

Dabei mußten folgende Parameter optimiert werden:

1. Konzentration des Borrelien-Antigens auf der Transfermembran
2. Konzentration und Inkubationszeit des unmarkierten gegen humane-IgG-Subklassen gerichteten Schafantikörpers (Detektionsantikörper)
3. Konzentration und Inkubationszeit des Peroxidase-markierten gegen Schafantikörper gerichteten Antikörpers vom Kaninchen (Färbeantikörper)

Der Versuch, durch eine höhere Antigenkonzentration von 2 beziehungsweise 4 mg Protein pro Gel und damit pro Blot die Sensitivität des Westernblots zu erhöhen, erwies sich im Verlauf der Vorversuche als nicht hilfreich, da die Kapazität der Transfermembran Proteine zu binden schon bei der normalen Antigenkonzentration von 1 mg Protein pro Gel beziehungsweise Blot gesättigt war (vergleiche Abbildung 13).

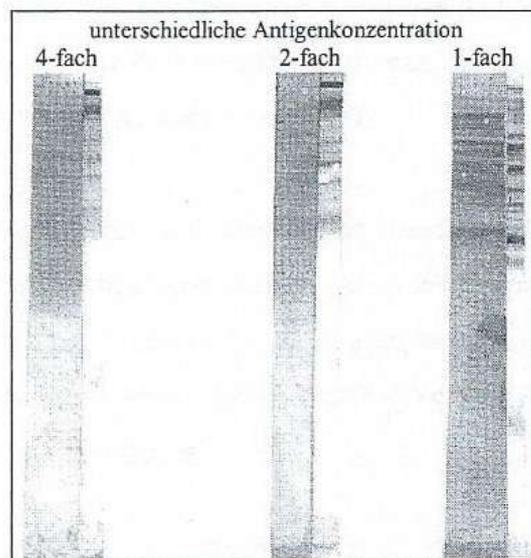


Abbildung 13: Vergleich verschiedener Antigenkonzentrationen zur Steigerung der Sensitivität des Westernblots

Daher wurde auch für die Herstellung der IgG-Subklassenblots auf jedes Gel 1 mg Antigen-Suspension in 1 ml Solubilisierungslösung (vergleiche Anhang 2: c) aufgetragen. Der Immunoblot wurde für eine Stunde in Blockierlösung (Anhang 4: l) geschwenkt, getrocknet und bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

5.1.3 Durchführung des IgG-Subklassen-Blots mit polyklonalen Antikörpern

Der vorbereitete Immunoblot wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und in Streifen zu jeweils 3 mm Breite geschnitten. Für die Analyse jeder IgG-Subklasse wurde ein einzelner Streifen benötigt, sodaß pro Patient insgesamt 4 Streifen für die IgG-Subklassenanalyse verwendet wurden.

Die Seren der Patienten wurden für eine Stunde im Verhältnis 1:2 mit Absorbtionslösung (Sonikat aus *Treponema phagedenis*) (Anhang 4: o) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Blockierlösung (Anhang 4: l) zum Verhältnis 1:100 aufgefüllt. Danach wurden jeweils 1 ml dieses vorbereiteten Serums auf jeden Streifen aufgebracht. Die Streifen wurden bei Raumtemperatur über Nacht auf einem Rüttler inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Streifen mit Waschlösung (Anhang 4: m) dreimal für jeweils 5 Minuten gewaschen.

5.1.3.1 Bestimmung der optimalen Konzentration der Detektionsantikörper

Es wurden polyklonale Antikörper zur Detektion der IgG-Subklassen verwendet.

Dabei handelte es sich um unmarkierte Schafs-Antikörper, die gegen humane IgG-Subklassen gerichtet waren (Anhang 5: e, S.109).

Um die optimale Arbeitskonzentration zu bestimmen, wurde zunächst auf einem Blot eine Verdünnungsreihe der Schafs-Antikörper erstellt. Dabei wurde zum einen die Konzentration der Schafs-Antikörper zwischen 1:250 und 1:1000, zum zweiten die Inkubationszeit zwischen einer und 1,5 Stunden variiert. Bei diesem Vorversuch erwies sich folgendes Schema der Konzentrationen als optimal:

Reagenz	Verdünnungsverhältnis
(a) ShAHu IgG1 = Schaf-anti-humanes-IgG1	1:1000
(a) ShAHu IgG2 = Schaf-anti-humanes-IgG2	1:1000
(a) ShAHu IgG3 = Schaf-anti-humanes-IgG3	1: 500
(a) ShAHu IgG4 = Schaf-anti-humanes-IgG4	1: 500

Tabelle 5: Arbeitskonzentrationen der polyklonalen Anti-IgG-Subklassen-Antikörper

Diese Antikörper wurden ebenfalls mit der Blockierlösung (Anhang 4: l) als Verdünnungsmedium auf die Arbeitskonzentration verdünnt. Während der Inkubation

wurden die Wannen auf einem Rüttler (Certomat R Typ 886302/4 Braun) bei Raumtemperatur bewegt.

Anschließend wurden die Streifen erneut dreimal für 5 Minuten mit der Blot-Waschlösung (Anhang 4: m) gewaschen.

5.1.3.2 Bestimmung der optimalen Konzentration des Färbeantikörper

Für den Färbeantikörper (Anhang 5: f, S. 109), ein Peroxidase-markierter Kaninchen-Antikörper, der gegen Schafs-Antikörper gerichtet war, wurde ebenfalls mit Hilfe einer Verdünnungsreihe eine Arbeitskonzentration von 1:1000 und eine Inkubationszeit von 1,5 Stunden als optimal bestimmt.

Die Inkubation erfolgte wie oben bei Raumtemperatur auf dem Rüttler.

Zum Abschluß wurden die Streifen ein letztes Mal wie zuvor beschrieben gewaschen und für 20 Minuten in Entwickler (Anhang 4: n) gelegt, um die Banden sichtbar zu machen. Um die Färbung zu beenden, wurden die Streifen mit destilliertem Wasser abgespült, getrocknet und zur Auswertung in der ursprünglichen Form aufgeklebt (vergleiche Abbildung 14).

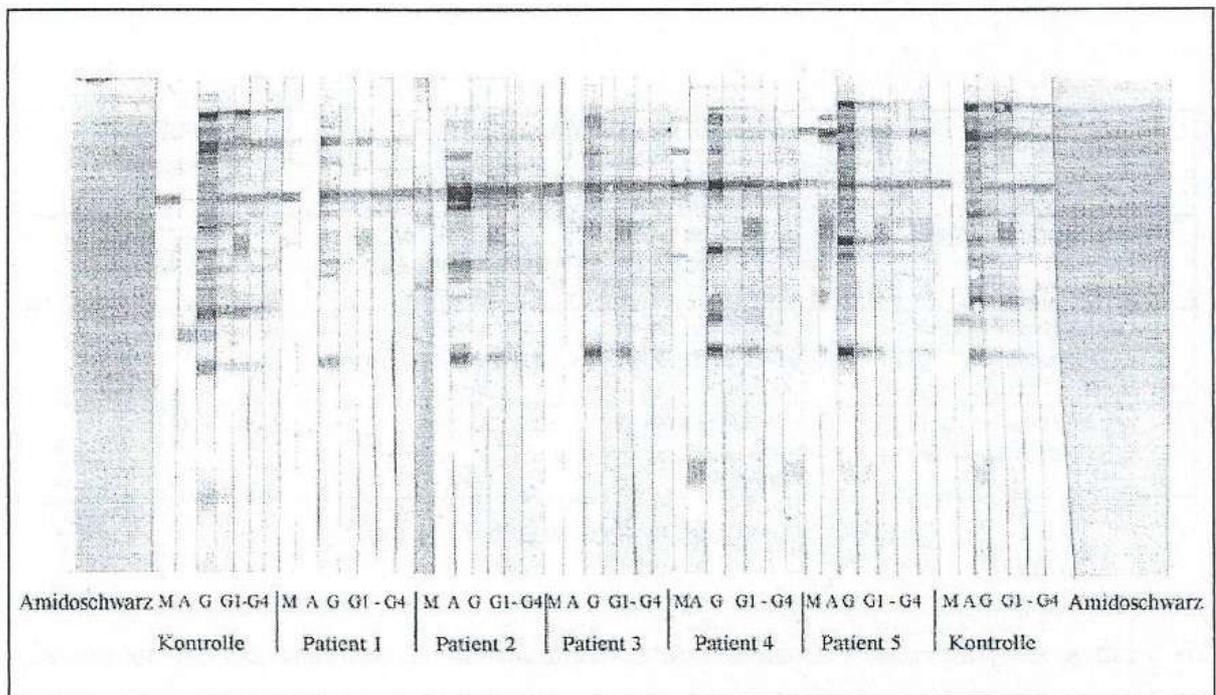


Abbildung 14: Beispiel eines IgG-Subklassen-Blots mit polyklonalen Antikörpern; Kontrolle = Patient mit hohen Antikörpertitern gegen *Borrelia burgdorferi*; Spezifität der gegen *Borrelia burgdorferi* gerichteten Antikörper: M = IgM-Antikörper; A = IgA-Antikörper; G = IgG-Antikörper; G1-G4 = IgG-Subklassen 1-4

Bei der Verwendung des polyklonalen Schafs-Antikörper ergaben sich folgende Probleme:

Bei Färbung der Streifen war auf dem Streifen für die IgG-Subklasse 2 ein gefärbtes Areal zu bemerken, die auf dem IgG-Gesamt-Streifen ungefärbt war (vergleiche Abbildung 15).

Nun mußte geklärt werden, wodurch diese zusätzliche Färbung zustande kam. Es konnte sich um eine Reaktion des Patientenserums, eine Kreuzreaktion der subklassenspezifischen Schafs-Antikörper oder der Peroxidase-markierten Kaninchen-Antikörper handeln.

Um diese Fragen zu klären wurden Negativkontrollen nach dem Schema in Tabelle 6 durchgeführt.

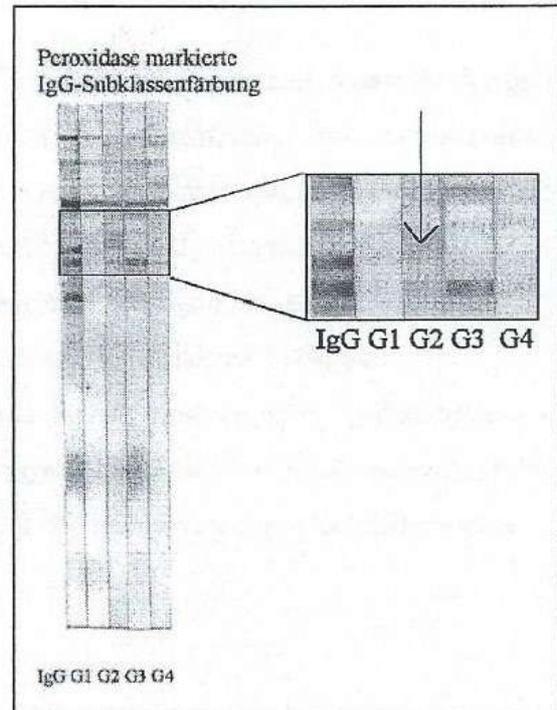


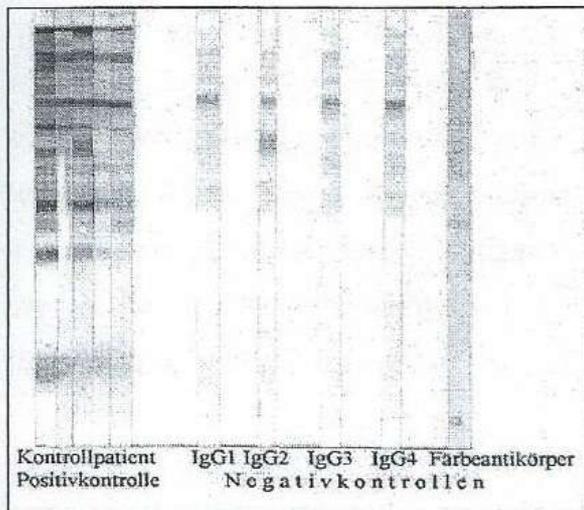
Abbildung 15: Kreuzreaktionen des IgG2-Antikörpers mit dem Borrelien-Antigen

Patienten-Antikörper	Schafs-Antikörper IgG-Subklassen spezifisch	Kaninchen-Antikörper Peroxidase markiert	Testzweck
in normaler Konzentration	in der normalen Arbeitskonzentration 1:1000	in der normalen Arbeitskonzentration 1:1000	Positivkontrolle
ohne	in der normalen Arbeitskonzentration 1:1000	in der normalen Arbeitskonzentration 1:1000	Negativkontrolle der IgG-Subklassen- Antikörper
ohne	ohne	in der normalen Arbeitskonzentration 1:1000	Negativkontrolle des Färbeantikörpers

Tabelle 6: Auftragsschema für die Negativkontrollen

Es wurden vier Streifen mit den normalen Konzentrationen als Positivkontrolle gefärbt, vier weitere Streifen wurden nur mit den Subklassen-spezifischen Schafs-Antikörper und den Schafs-spezifischen Kaninchen-Antikörper behandelt. Ein zusätzlicher Streifen wurde nur mit den Schafs-spezifischen Kaninchen-Antikörpern inkubiert.

In der folgenden Abbildung (16) sind die Ergebnisse dieser Negativkontrollen dargestellt:



Hier stellte sich heraus, daß sowohl die IgG-Subklassen-spezifischen Schafs-Antikörper wie auch die Schaf-spezifischen-Kaninchen-Antikörpern sich unspezifisch an das Borrelien-Antigen banden, ohne daß Patienten-Antikörper vorlagen.

Aus diesem Grund mußte zur Bearbeitung der Fragestellung die Anti-Subklassen-Antikörper und das Färbesystem gewechselt werden.

Abbildung 16: Darstellung der Negativkontrollen der Schafs-Antikörper

5.1.4 Durchführung des Subklassen-Blots mit monoklonalen Antikörpern

5.1.4.1 Auswahl des Färbesystems für die monoklonalen Antikörper

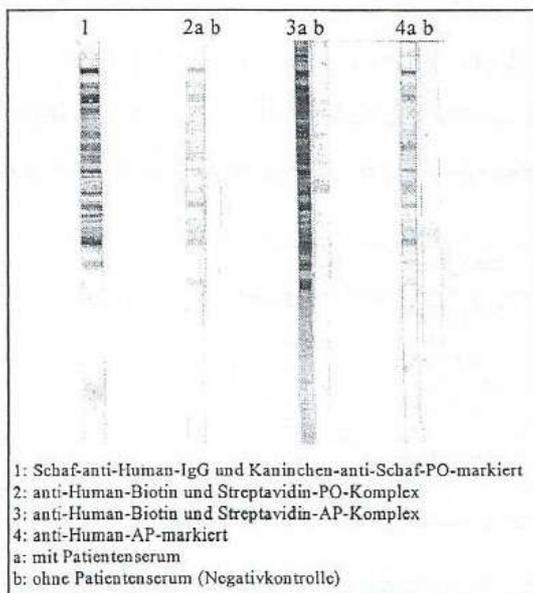


Abbildung 17: Auswahl verschiedener Färbesysteme

Es wurde ein Färbesystem gesucht, das bei optimaler Empfindlichkeit keine unspezifischen Reaktionen mit dem Borrelien-Antigen aufwies. Dazu wurden verschiedene Enzymmarkierungen und Antikörper verschiedener Spezies getestet, mit denen die Patientenantikörper gefärbt werden sollten. Die Ergebnisse sind Abbildung 17 dargestellt.

Zur Anfärbung von monoklonalen, subklassenspezifischen Maus-IgG-Antikörpern waren mit alkalischer Phosphatase markierte Anti-Maus-IgG-Antikörper vom Kaninchen

am besten geeignet, da es in diesem System zu keinerlei unspezifischen Reaktionen kam.

Nun wurde für die Anfärbung der IgG-Subklassen jeweils ein unmarkierter monoklonaler Antikörper von der Maus, der selektiv gegen das Fc-Stück einer IgG-Subklasse gerichtet war, verwendet. In einem Vorversuch wurde kontrolliert, ob es zu einer Kreuzreaktion zwischen diesem Färbesystem und dem Borrelien-Antigen kommt, dies war, wie Abbildung 18 demonstriert, nicht der Fall.

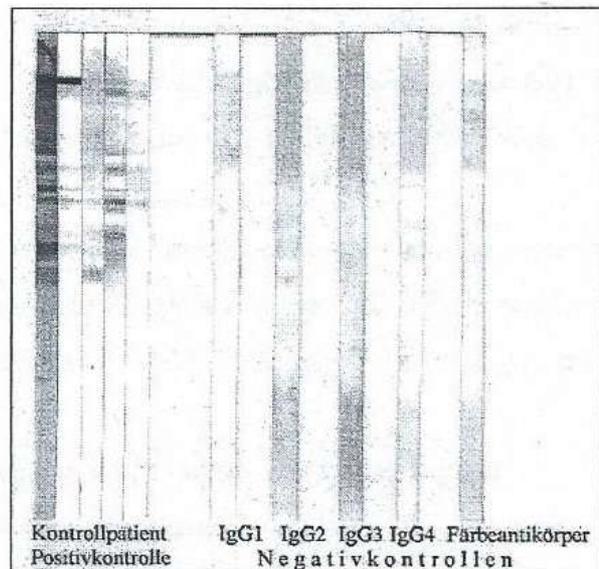


Abbildung 18: Darstellung der Negativkontrollen der monoklonalen Antikörper

Im Gegensatz zur bisherigen Inkubation des Serums wurde nun das Patientenserum im Verhältnis 1:100 mit Tris-Tween-0.05%-AP-Puffer (Anhang 5: h) als Verdünnungsmedium aufgetragen und über Nacht auf einem Rüttler (s.o.) inkubiert. Die Streifen wurden am nächsten Morgen dreimal für jeweils fünf Minuten mit Waschpuffer (Anhang 4: m) gewaschen.

5.1.4.2 Bestimmung der optimalen Konzentration der Detektionsantikörper

Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe wurde die optimale Arbeitskonzentration des Maus-Antikörpers bestimmt, sodaß die monoklonalen Antikörper (Anhang 5: k, S.110) während der weiteren Untersuchung nach folgendem Schema aufgetragen wurden:

Reagenz	Verdünnungsverhältnis
Anti-IgG1	1:3000
Anti-IgG2	1:2000
Anti-IgG3	1:5000
Anti-IgG4	1:5000

Tabelle 7: Arbeitskonzentration der monoklonalen Anti-IgG-Subklassen-Antikörper

Ebenso wurde für die Inkubationszeit 1,5 Stunden bei Raumtemperatur als geeignet ermittelt. Anschließend wurden nicht gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (Anhang 4: m) für jeweils fünf Minuten entfernt.

5.1.4.3 Bestimmung der optimalen Konzentration für die Färbeantikörper

Der Färbeantikörper, ein mit alkalischer Phosphatase markierter Kaninchen-Antikörper (Anhang 5: 1, S.110), der gegen Maus-Antikörper (Maus-IgG) gerichtet war, wurde nach der Empfehlung des Herstellers mit einer Arbeitskonzentration von 1:3000 mit Tris-Tween-Puffer als Verdünnungsmedium verwendet.

Auch nach dieser Inkubation wurden nicht gebundene Antikörper durch Waschen entfernt. Damit sich der für die Farbreaktion der alkalischen Phosphatase benötigte pH einstellte, wurde wurden die Streifen nun für 10 Minuten mit Tris-AP-Puffer pH 9,5 (Anhang 5: m) benetzt.

Parallel wurden die Entwicklerlösungen (Anhang 5: n, o) in der benötigten Menge

hergestellt und kurz vor Gebrauch gemischt.

Zur Beschleunigung der Enzymreaktion wurde die Chromogenlösung (Anhang 5: g) auf etwa 20 °C angewärmt. Auf jeden Streifen wurden 1 ml Entwickler aufgebracht und für fünf Minuten belassen. Die Färbung wurde durch Abspülen der Streifen mit destilliertem Wasser und Trocknen beendet.

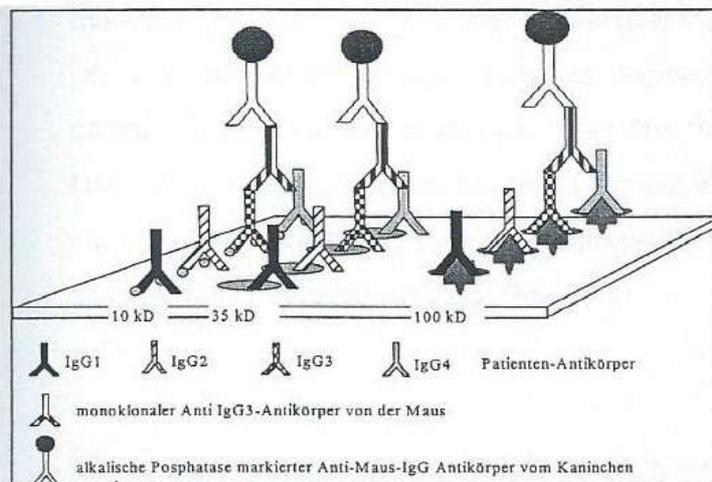


Abbildung 19: Aufbau eines Westernblots mit monoklonaler Detektion der Subklasse IgG3

Anschließend wurden auch hier die Streifen für die Auswertung in der ursprünglichen Form aufgeklebt.

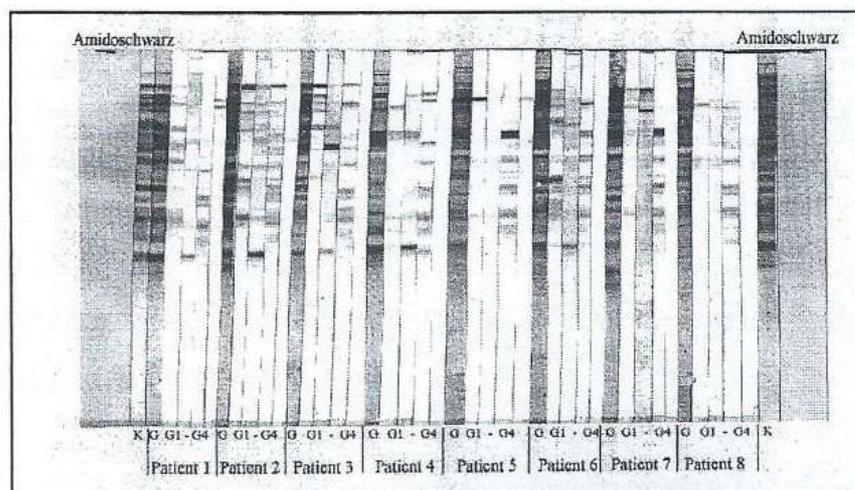


Abbildung 20: Beispiel eines fertigen IgG-Subklassen Blots mit monoklonalen Antikörpern.

K = gegen *Borrelia burgdorferi* gerichtete IgG-Antikörper eines seropositiven Patienten ;

Spezifität der gegen *Borrelia burgdorferi* gerichteten Antikörper:

G = IgG-Antikörper; G1-G4 = IgG-Subklassen 1-4

5.2 Darstellung der klinischen und serologischen Ergebnisse bei der symptomatischen Patientengruppe im Querschnitt und im Verlauf

5.2.1 Ergebnisse aller symptomatischen Patienten

5.2.1.1 Klinische Ergebnisse aller symptomatischen Patienten

In dieser Studie wurden insgesamt 62 Patienten mit positiver Borrelien-Serologie aus den Stadien 1 bis 3 einer Lyme Borreliose untersucht. Das erste Stadium der Lyme-Borreliose ist mit einer Lokalinfection der Haut, das zweite mit Organbefall und das dritte mit einem chronischem Krankheitsverlauf, wie unter dem Punkt 1.2 definiert, verbunden.

Die Patienten litten an einem Erythema chronicum migrans (ECM), einer Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), einer Meningoradikulitis oder einer Lyme Arthritis und damit an einer sicher symptomatischen Borreliose.

Die Gruppe der symptomatischen Patienten wurde anhand der Krankheitsstadien aufgliedert.

<i>Parameter</i>	<i>symptomatische Patienten n = 62</i>	<i>Patienten des Stadium 1 n = 10</i>	<i>Patienten des Stadium 2 n = 38</i>	<i>Patienten des Stadium 3 n = 14</i>
<i>Alter</i>	M = 51,2 Jahre SD = 15,2	M = 54,6 Jahre SD = 14,1	M = 52,1 Jahre SD = 13,6	M = 46,3 Jahre SD = 20,0
<i>Geschlecht</i>	Männer = 23 Frauen = 37	Männer = 0 Frauen = 10	Männer = 17 Frauen = 21	Männer = 6 Frauen = 8

Tabelle 8: Vergleich der Krankheitsstadien anhand des Alters und des Geschlechts

Tabelle 8 zeigt, daß das durchschnittliche Alter bei diesen Patienten um 50 Jahre lag. Die Altersverteilung ist in allen Stadien gleich.

Im Stadium 1 der Borreliose wurden ausschließlich Frauen erfaßt.

Die Patienten wiesen folgende klinische Syndrome auf:

<i>Stadium</i>	<i>Leitdiagnosen</i>	<i>Anzahl</i>
Stadium 1	ECM	n = 10
Stadium 2	Meningitis	n = 2
	Meningoradikulitis	n = 9
	Meningoradikulitis mit cranialer Neuritis	n = 15
	Meningo- (-neur- /-radiukul- /-myel- / -encephal-) -itis	n = 5
	Lyme-Arthritis	n = 6
Stadium 3	ACA	n = 9
	zerebrovaskuläre Neuroborreliose	n = 1
	chronisch progressive Encephalomyelitis	n = 3
	Morphea mit Myositis	n = 1

Tabelle 9: Krankheitsbilder der symptomatischen Patienten

Bei allen Patienten mit neurologischen Krankheitsbildern ließ sich eine borrelienspezifische intrathekale Antikörperproduktion nachweisen. Dies ist für die Diagnose einer Neuroborreliose ausschlaggebend.

Bei dermatologischen Krankheitsbildern wurden die Diagnose zum Teil im Vorfeld durch Dermatologen histologisch gesichert, bei rheumatologischen Krankheitsbildern wurden andere Ursachen ausgeschlossen, außerdem entsprachen die Syndrome den diagnostischen Kriterien der Lyme Arthritis von Steere et al. (1979).

5.2.1.2 Ergebnisse der IgG-Subklassen Nephelometrie aller symptomatischer Patienten

Da bei den Patienten die borrelienspezifischen IgG-Subklassen untersucht werden sollten, mußte sicher gestellt werden, das alle Probanden normale Konzentrationen der IgG-Subklassen produzierten.

Dazu wurden die Konzentrationen der einzelnen IgG-Subklassen unabhängig von ihrer Spezifität mit Hilfe der Nephelometrie aus dem Serum des Patienten bestimmt.

Bei dieser Patientengruppe ergab die IgG-Subklassen Nephelometrie folgende Ergebnisse:

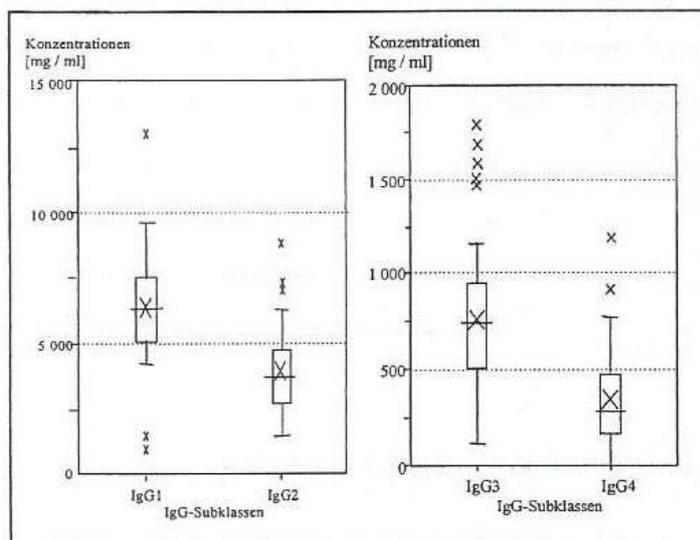


Abbildung 21: IgG-Subklassenkonzentration bei Patienten mit symptomatischer Borreliose

Es konnten bei zwei Patienten der Gesamtgruppe keine Antikörper der Subklasse IgG4 gemessen werden. Sie wurden als IgG4-defizient gewertet und bei der weiteren Untersuchung nicht verwendet. Im übrigen entsprachen die Werte der IgG-Subklassenkonzentrationen der IgG-Subklassenverteilung bei gesunden Erwachsenen (Hamilton 1987).

5.2.2 Ergebnisse der Patienten mit einer Borreliose des Stadium 1

5.2.2.1 klinische Ergebnisse der Patienten mit einer Borreliose des Stadium 1

Bei der Erstuntersuchung wurden 8 Patienten im Stadium 1 einer Borreliose erfaßt. Bei 7 Patienten lag ein ECM vor, das im Mittel seit 7 Wochen bestand. Damit war die Krankheit bei diesen Patienten aktiv. Bei einer Patientin war das ECM eine Woche vor der Untersuchung abgeheilt. Eine Therapie war bis zu diesem Zeitpunkt nicht durchgeführt worden.

<i>Parameter</i>	<i>Patienten bei der Erstuntersuchung n = 8</i>	<i>Patienten bei der ersten Nachuntersuchung n = 7</i>	<i>Patienten bei der zweiten Nachuntersuchung n = 2</i>
<i>Alter</i>	M = 56,3 Jahre SD = 9,5	M = 57,7 Jahre SD = 11,7	Patient 1: 25 Jahre Patient 2: 71 Jahre
<i>Geschlecht</i>	Männer = 0 Frauen = 8	Männer = 0 Frauen = 7	Frauen = 2
<i>Dauer der Krankheit zum Untersuchungszeitpunkt</i>	Median = 1 Monat Intervall = 0 - 6	Median = 3 Monate Intervall = 2 - 6	Patient 1: 17 Monate Patient 2: 74

Tabelle 10: Zusammenstellung von klinischen Daten der Patienten mit Borreliose des Stadium 1 an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Die Nachuntersuchungen der Patienten erfolgten im Mittel 3 Monate beziehungsweise mehr als ein Jahr nach der Erstuntersuchung. Im Rahmen der ersten Nachuntersuchung wurden 7 Patienten mit ECM untersucht. Das ECM war bei allen Patienten abgeheilt und lag im Mittel 2,5 Monate zurück. Bei 5 der Patienten wurde vor dieser Untersuchung eine antibiotische Therapie durchgeführt.

Bei der zweiten Nachuntersuchung wurden zwei Patienten erfaßt. Das ECM lag im einen Fall 17 Monate und im anderen Fall 72 Monate zurück.

5.2.2.2 Ergebnisse des ELISA, IFT und IFT-Abs mit einer Borreliose des Stadium 1

Bei der Erstuntersuchung lagen die ELISA-Werte im Mittel bei 628,3 Einheiten und lagen damit deutlich über dem Cutt-off Wert von 200 Einheiten. Ebenso waren die Titer im IFT und IFT-Abs positiv.

Bei einer Patientin lagen die ELISA-Werte mit 173 Einheiten unterhalb des Cutt-off von 200 Einheiten für einen positiven ELISA-Wert. Damit war bei dieser Patientin trotz klinisch gesicherter Borreliose der Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* negativ.

<i>Parameter</i>	<i>Patienten bei der Erstuntersuchung n = 8</i>	<i>Patienten bei der ersten Nachuntersuchung n = 7</i>	<i>Patienten bei der zweiten Nachuntersuchung n = 2</i>
<i>ELISA</i>	Median : 350 Einheiten Intervall: 173 - 1987	Median : 332 Einheiten Intervall : 55 - 963	Patient 1: 49 Einheiten Patient 2: 1041
<i>IFT</i>	Median : 1:320 Intervall: 1:40 - 1:640	Median : 1:160 Intervall: 1:1:10 - 1:320	Patient 1: 0 Patient 2: 640
<i>IFT-Abs</i>	Median : 1:80 Intervall: 1:0 - 1:640	Median :1:80 Intervall: 1:0 - 1:160	Patient 1: 0 Patient 2: 640

Tabelle 11: Darstellung der serologischen Ergebnisse der Patienten mit einer Borrelien-Infektion im Stadium 1

Im zeitlichen Verlauf nahmen die ELISA-Werte, IFT und IFT-Abs-Titer bei den Patienten ab.

5.2.2.3 Ergebnisse des IgM- und IgG-Westernblots mit einer Borreliose im Stadium 1

In der Abbildung 22 sind die Ergebnisse der borrelienspezifischen IgM- und IgG-Westernblots von Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1 so aufbereitet, daß die Graufärbungen der Felder für die einzelnen Partialantigene der Häufigkeit entspricht, mit der dieses Partialantigen von dieser Patientengruppe erkannt wurde (vergl. S. 31/32).

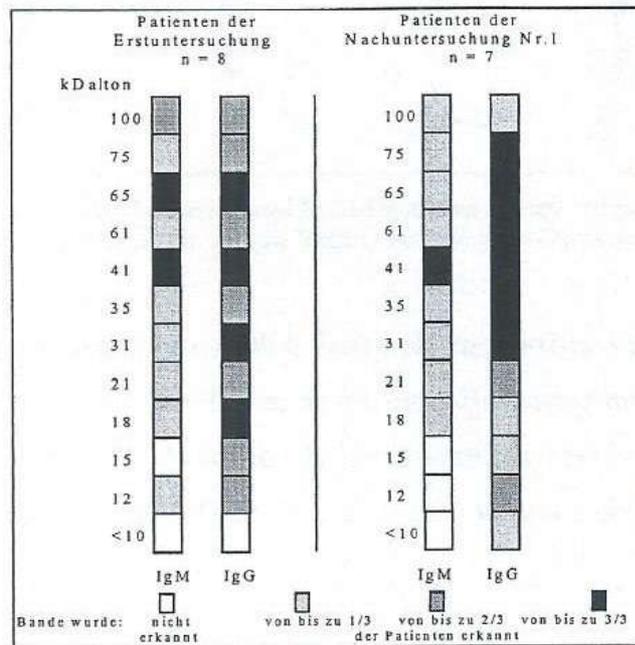


Abbildung 22: IgM- und IgG-Westernblotergebnisse der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1

Insgesamt wurden mehr IgG- als IgM-Banden sichtbar. Auffällig war, daß das 41 k Dalton-Antigen (Flagellin) von nahezu allen Patienten erkannt wurde.

Dies war, wie unten dargestellt wird, nicht nur bei dieser Patientengruppe, sondern bei allen untersuchten Gruppen unabhängig von der Symptomatik der Fall.

Auch bei den beiden Nachuntersuchungen wurde das 41-k Dalton-Antigen im IgM- und IgG-Blot am häufigsten erkannt.

5.2.2.4 Ergebnisse des IgG-Subklassen-Westernblots bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1

Die IgG-Subklassenantwort der Patienten wurde mit Hilfe von Immunoblots für die vier IgG-Subklassen untersucht. Bei der Auswertung der Blotstreifen eines Patienten, wurden die Anzahl der Banden je IgG-Subklasse und deren Intensität erfaßt. Die Subklasse mit den meisten und stärksten Banden wurde dominierend genannt. Lagen in zwei IgG-Subklassen gleich viele und gleich intensive Banden vor, so wurden diese beiden IgG-Subklassen kodominant genannt.

Anschaulich wird diese Auswertung in Abbildung 23. Bei diesem Beispiel lag bei den ersten drei Patienten eine IgG1-Dominanz vor, bei den letzten drei Patienten eine IgG3-Dominanz.

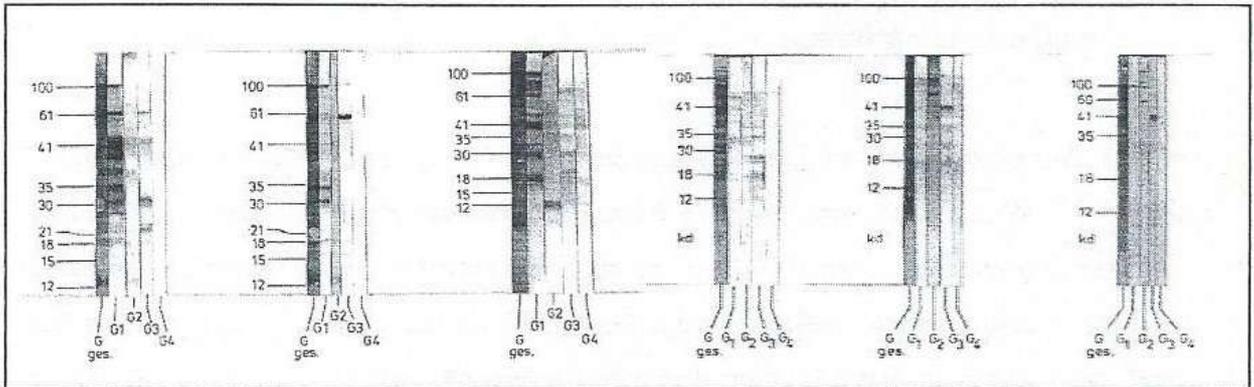


Abbildung 23: Darstellung der IgG1-Dominanz und IgG3-Dominanz anhand von sechs Patienten, die ersten drei weisen eine IgG1-Dominanz auf, die letzten drei eine IgG3-Dominanz

Nach dieser Methode wurden die Blots aller Patienten ausgewertet. In der folgenden Tabelle (Tabelle 12) sind die Ergebnisse der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1 dargestellt. Es zeigte sich, daß einige IgG-Subklassen häufiger dominierten als andere. So wurde bei der Erstuntersuchung häufig eine IgG1-Dominanz gefunden, während eine IgG3-Dominanz selten vorlag.

<i>Dominanz</i>	<i>Patienten bei der Erstuntersuchung n = 8</i>	<i>Patienten bei der Nachuntersuchung 1 n = 7</i>	<i>Patienten bei der Nachuntersuchung 2 n = 2</i>
<i>IgG1</i>	3 (38%)	2 (29%)	
<i>IgG2</i>	2 (25%)	3 (42%)	
<i>IgG3</i>	1 (12%)	2 (29%)	
<i>IgG1+IgG3</i>			1
<i>IgG2+IgG3</i>	1 (12%)		1
<i>keine Dominanz</i>	1 (12%)		

Tabelle 12: IgG-Subklassendominanz bei Patienten mit Borreliose im Stadium 1 zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Bei der Nachuntersuchung dieser Patienten zeigte sich, daß der Anteil der Patienten mit einer IgG1-Dominanz abnahm, während die Anzahl der Patienten mit einer IgG3-Dominanz zunahm.

Da nur wenige Patienten aus diesem Krankheitsstadium untersucht worden waren, ließen sich diese Unterschiede nicht statistisch belegen.

5.2.3 Ergebnisse der Patienten mit einer Borreliose des Stadium 2

5.2.3.1 Klinische Ergebnisse der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2

Bei der Erstuntersuchung wurden 23 Patienten im Stadium 2 der Borreliose erfaßt. Davon litten 17 Patienten an einer Neuroborreliose und 6 an einer Lyme-Arthritis. Bei 17 Patienten wurde diese Erstuntersuchung während der ersten Woche der klinischen Symptomatik durchgeführt, bei 6 Patienten lag der Symptombeginn zwischen 14 Tagen und 3 Monaten zurück. Bei 20 der untersuchten Patienten ließen sich zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung entzündliche Veränderungen nachweisen. So lag bei den Patienten mit einer Neuroborreliose eine Pleozytose und bei Patienten mit einer Arthritis ein entzündlicher Gelenkerguß vor. Bei drei Patienten bestand zu diesem Zeitpunkt ein klinischer Normalbefund.

<i>Parameter</i>	<i>Patienten bei der Erstuntersuchung n = 23</i>	<i>Patienten bei der ersten Nachuntersuchung n = 14</i>	<i>Patienten bei der zweiten Nachuntersuchung n = 18</i>
<i>Alter</i>	M = 50,3 Jahre SD = 13,6	M = 48,5 Jahre SD = 15,9	M = 55,7 Jahre SD = 12,7
<i>Geschlecht</i>	Männer = 9 Frauen = 14	Männer = 7 Frauen = 8	Männer = 11 Frauen = 7
<i>Dauer der Krankheit zum Untersuchungs- zeitpunkt</i>	Median = 1 Monat Intervall = 0 - 3	Median = 4 Monate Intervall = 1 - 13	Median = 50 Monate Intervall = 14 - 120

Tabelle 13: Zusammenstellung von klinischen Daten der Patienten mit Borreliose des Stadium 2 an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Bei 4 Patienten (alle vier mit Neuroborreliose) war vor der ersten serologischen Untersuchung bereits eine Therapie durchgeführt worden: ein Patient war 1 Monat zuvor mit Doxycyclin und steroidalen Antiphlogistika behandelt worden, der zweite ebenfalls mit Doxycyclin, ein dritter allein mit steroidalen Antiphlogistika und der vierte mit nicht-steroidalen Antiphlogistika.

Erste Nachuntersuchung: Diese Untersuchung erfolgte im Mittel 4 Monate nach der Erstuntersuchung. Aus dieser Gruppe wurden 14 Patienten einbezogen. Elf der Patienten wiesen ursprünglich eine Meningoradikulitis auf, die bei vieren zu diesem Zeitpunkt vollständig abgeklungen war. Weitere sieben Patienten wiesen noch immer eine Pleozytose

auf, jedoch hatte sich bei allen die Krankheit bis zu diesem Zeitpunkt klinisch schon deutlich gebessert.

Bei den übrigen drei Patienten lag ursprünglich eine Lyme Arthritis vor. Bei einem Patienten war sie bereits ausgeheilt, bei den beiden anderen waren noch entzündliche Ergüsse in den betroffenen Gelenken vorhanden, die sich aber gegenüber dem Ausgangsbefund in Rückbildung befanden.

Vor der serologischen Kontrolle zum Zeitpunkt der zweiten Nachuntersuchung waren aus dieser Gruppe 13 Patienten therapiert worden. Am häufigsten wurde die Behandlung mit Antibiotika (vor allem mit Cefotaxim) und steroidalen Antiphlogistika durchgeführt.

Zweite Nachuntersuchung : Im Rahmen der Kontrolluntersuchung nach 12 Monaten wurden 18 Patienten erfaßt: 17 mit Meningoradikulitis, 1 mit Lyme-Arthritis. Neun Patienten waren symptomfrei, bei den übrigen neun bestanden Defektzustände geringeren Ausmaßes ohne Hinweise auf eine aktive Erkrankung.

5.2.3.2 Ergebnisse des ELISA, IFT und IFT-ABS der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2

Für das Vorliegen einer Neuroborreliose dient der Nachweis einer intrathekalen Antikörper-Produktion als ein diagnostisches Kriterium. Bei allen Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 war der intrathekale Antikörpernachweis positiv. Damit war die Verdachtsdiagnose Neuroborreliose gesichert.

Patienten in diesem Krankheitsstadium wiesen zudem in der Regel einen positiven ELISA-Titer im Serum auf, doch befanden sich auch in dieser Gruppe 5 Patienten bei denen der ELISA-Titer negativ war. Somit lag bei diesen Patienten trotz negativem ELISA eine gesicherte Neuroborreliose vor.

<i>Parameter</i>	<i>Patienten bei der Erstuntersuchung n = 23</i>	<i>Patienten bei der ersten Nachuntersuchung n = 14</i>	<i>Patienten bei der zweiten Nachuntersuchung n = 18</i>
<i>ELISA</i>	Median :348 Einheiten Intervall: 43 - 2056	Median : 401 Einheiten Intervall: 109 - 1600	Median : 376 Einheiten Intervall: 18 - 1795
<i>IFT</i>	Median : 1:320 Intervall: 1:0 - 1:640	Median : 1:160 Intervall: 1:40 - 1:640	Median : 1:160 Intervall: 1:10 - 1:640
<i>IFT-ABS</i>	Median : 1:80 Intervall: 1:0 - 1:640	Median : 1:40 Intervall: 1:0 - 1:640	Median : 1:40 Intervall: 1:0 - 1:640

Tabelle 14: Darstellung der serologischen Ergebnisse der Patienten mit einer Borrelien-Infektion im Stadium 2

Auch in dieser Gruppe nahmen die Titer der serologischen Parameter im zeitlichen Verlauf ab.

5.2.3.3 Ergebnisse des IgM- und IgG-Westernblots der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2

Bei der Erstuntersuchung wurden im IgM-Blot am häufigsten das 41-k Dalton-Partialantigen und, etwas seltener, die übrigen Partialantigene zwischen 75- und 31-k Dalton erkannt (Abbildung 24).

Zu diesem Zeitpunkt, im Mittel einen Monat nach Krankheitsbeginn, wurden mehr Partialantigene mit IgG- als mit IgM-Antikörpern erkannt.

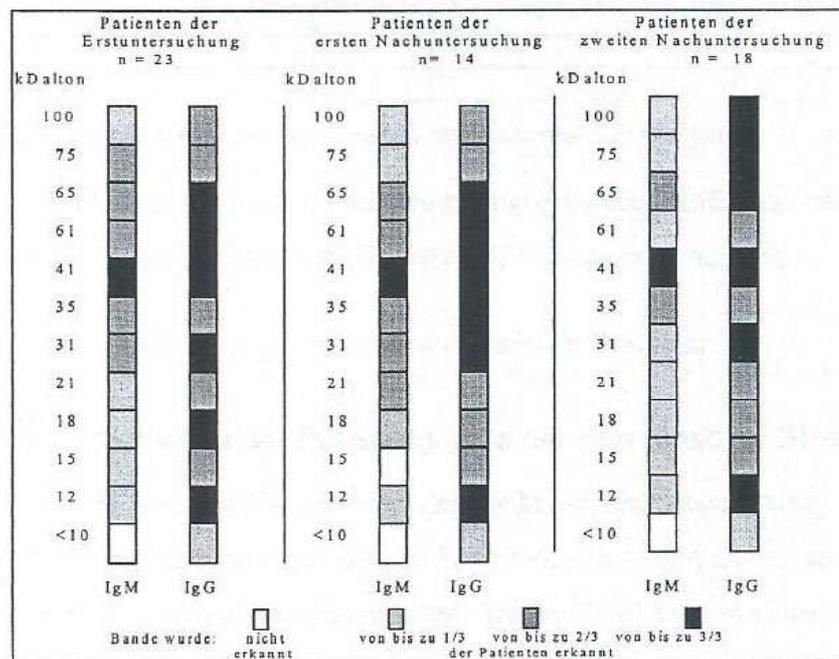


Abbildung 24: Darstellung der IgM- und IgG-Westernblotergebnisse der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung und der beiden Nachuntersuchungen

Im zeitlichen Verlauf nahm die Anzahl der mit IgM erkannten Partialantigene weiter ab. Dies wird aus der obigen Darstellung daran erkennbar, daß bei den beiden Nachuntersuchungen weniger Banden von bis zu 2/3 beziehungsweise 3/3 aller Patienten erkannt wurde.

Mit IgG-Antikörpern wurde insbesondere das 100- und das 75- k Dalton-Antigen häufig erkannt.

5.2.3.4 Ergebnisse des IgG-Subklassen-Westernblots der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2

Die Patienten mit einer gesicherten Borreliose im Stadium 2 wiesen bei der Erstuntersuchung sehr häufig eine IgG3-Dominanz auf, während eine IgG1-Dominanz deutlich seltener zu beobachten war (Tabelle 15).

Dominanz	Patienten bei der Erstuntersuchung n = 23	Patienten bei der Nachuntersuchung 1 n = 15	Patienten bei der Nachuntersuchung 2 n = 18
<i>IgG1</i>	5 22%	5 33%	1 6%
<i>IgG2</i>			1 6%
<i>IgG3</i>	10 43%	9 60%	10 55%
<i>IgG1+IgG3</i>	5 22%	1 7%	6 33%
<i>IgG1+IgG2+IgG3</i>	1 4%		
<i>keine Dominanz</i>	2 9%		

Tabelle 15: IgG-Subklassendominanz bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2

Im zeitlichen Verlauf nahm auch bei dieser Patientengruppe die Häufigkeit einer IgG1-Dominanz weiter ab, während die Häufigkeit der IgG3-Dominanz zunahm.

5.2.4. Ergebnisse der Patienten mit einer Borreliose des Stadium 3

5.2.4.1 Klinische Ergebnisse der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3

An einer Borreliose im Stadium 3 waren zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung 9 Patienten erkrankt. Zwei Patienten litten an einer aktiven Neuroborreliose und sieben an einer ACA, davon vier Patienten im exsudativ-erythematösem Stadium und drei im sklerotischen Stadium. Der Symptombeginn lag zwischen 6 und 24 Monaten, in einem Fall 240 Monate zurück (Tabelle 16).

Parameter	Patienten bei der Erstuntersuchung n = 9	Patienten bei der ersten Nachuntersuchung n = 5	Patienten bei der zweiten Nachuntersuchung n = 9
<i>Alter</i>	M = 49 Jahre SD = 20	M = 54 Jahre SD = 21	M = 42 Jahre SD = 22
<i>Geschlecht</i>	Männer = 4 Frauen = 5	Männer = 4 Frauen = 1	Männer = 5 Frauen = 3
<i>Dauer der Krankheit zum Untersuchungszeitpunkt</i>	Median = 12 Monate Intervall = 6 - 240	Median = 13 Monate Intervall = 10 - 35	Median = 44 Monate Intervall = 21 - 246

Tabelle 16: Zusammenstellung von klinischen Daten der Patienten mit Borreliose des Stadium 3 an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Bei der ersten Nachuntersuchung wurden vier Patienten mit ACA untersucht, davon 3 mit ACA im sklerotischen Stadium und ein Patient bei dem die ACA vollständig abgeheilt war. Zusätzlich befand sich in dieser Gruppe ein Patient mit einer chronischen Neuroborreliose, bei dem die Zellzahlen im Liquor rückläufig waren, es bestand aber als Defektzustand noch eine sensible Ataxie.

Im Rahmen der zweiten Nachuntersuchung wurden drei Patienten mit chronisch progressiver Encephalomyelitis, eine Patientin mit zerebrovaskulärer Neuroborreliose, drei mit ACA, eine mit Myositis erfaßt. Bei sechs der Patienten lag ein Defektzustand vor, das heißt die Infektion hatte funktionelle Schäden hinterlassen. Bei einem Patienten mit Neuroborreliose und einem mit ACA waren die Infektionen klinisch ohne Dauerschäden ausgeheilt.

5.2.4.2 Ergebnisse des ELISA, IFT und IFT-ABS der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3

Die Patienten des dritten Erkrankungsstadiums zeigten bei den serologischen Untersuchungen im Rahmen der Erstuntersuchung extrem hohe Werte beim ELISA und dem IFT-ABS. Dies ist nicht überraschend, da diese Patienten sich bis zur Diagnosestellung definitionsgemäß schon mindestens 6 Monate mit dem Erreger auseinander gesetzt hatten. Andererseits ist der Bereich den die ELISA-Einheiten umfassen besonders groß (Tabelle 17).

<i>Parameter</i>	<i>Patienten bei der Erstuntersuchung n = 9</i>	<i>Patienten bei der ersten Nachuntersuchung n = 5</i>	<i>Patienten bei der zweiten Nachuntersuchung n = 9</i>
<i>ELISA</i>	Median = 1336 Einheiten Intervall = 530 - 2200	Median = 689 Einheiten Intervall = 392 - 1691	Median = 484 Einheiten Intervall = 111 - 1970
<i>IFT</i>	Median = 1:640 Intervall = 1:160 - 1:640	Median = 1:480 Intervall = 1:80 - 1:640	Median = 1:240 Intervall = 1:0 - 1:640
<i>IFT-Abs</i>	Median = 1:640 Intervall = 1:80 - 1:640	Median = 1:240 Intervall = 1:40 - 1:640	Median = 1:100 Intervall = neg - 1:640

Tabelle 17: Darstellung der serologischen Ergebnisse der Patienten mit einer Borrelien-Infektion im Stadium 3

Auch bei der ersten und zweiten Nachuntersuchung wurde bei den Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 sehr hohe ELISA-, IFT- und die IFT-Abs-Werte gemessen. Jedoch hatten die Antikörper-Konzentrationen auch bei dieser Patientengruppe im zeitlichen Verlauf abgenommen.

5.2.4.3 Ergebnisse des IgM- und IgG-Westernblots der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3

Bei Patienten im Stadium 3 der Borreliose lagen bei der Erstuntersuchung mehrere spezifische IgM-Antikörper vor. Vor allem Antikörper gegen höhermolekulare Partialantigene wie das 100-, 75- und das 65-k Dalton-Partialantigen ließen sich öfters nachweisen. IgG-Antikörper ließen sich gegen fast alle Borrelien-Partialantigene nachweisen, besonders häufig gegen das 100-, 65-, und 41-k Dalton-Partialantigen (Abbildung 25).

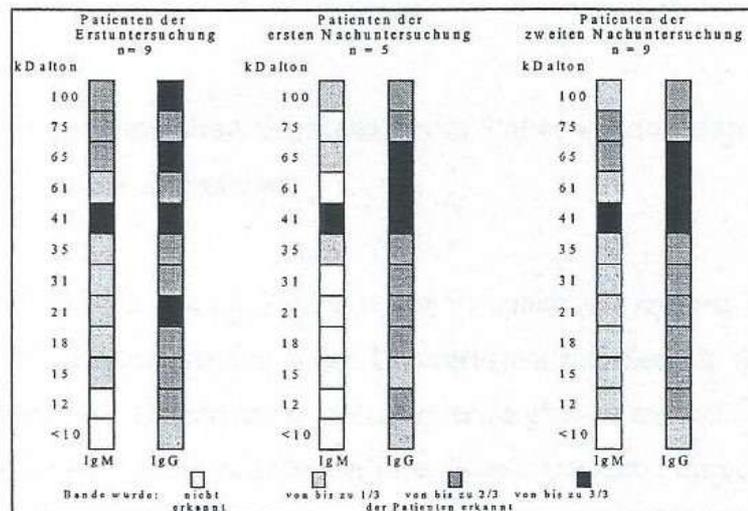


Abbildung 25: Darstellung der IgM- und IgG-Westernblotergebnisse der Patienten mit einer Borreliose des Stadiums 3

Bei den Nachuntersuchungen nahm die Anzahl der IgM-Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* spezifische Partialantigene ab, während die Anzahl der IgG-Banden gleich blieb.

5.2.4.4 Ergebnisse des IgG-Subklassen-Westernblots der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3

Bei der Erstuntersuchung lag bei der Patientengruppe der Borreliosen im Stadium 3 sehr häufig eine IgG1-Dominanz vor, während eine IgG3-Dominanz nicht beobachtet wurde (Tabelle 18).

Dominanz	Patienten bei der Erstuntersuchung n = 9	Patienten bei der ersten Nachuntersuchung n = 5	Patienten bei der zweiten Nachuntersuchung n = 9
<i>IgG1</i>	7 78%	2 40%	2 22%
<i>IgG2</i>			2 22%
<i>IgG3</i>		1 20%	3 33%
<i>IgG1+IgG3</i>	1 11%	2 40%	1 11%
<i>IgG1+IgG4</i>	1 11%		
<i>keine Dominanz</i>			1 11%

Tabelle 18: IgG-Subklassendominanz bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3

Auch bei den Patienten des Stadium 3 nahm im Verlauf die Anzahl der Patienten ab, die eine IgG1-Dominanz im Westernblot aufwiesen. Demgegenüber nahm die Anzahl der Patienten mit einer IgG3-Dominanz zu.

5.2.5 Vergleich der Patienten mit einer symptomatischen Borreliose aus den verschiedenen Krankheitsstadien

Wie oben beschrieben läßt sich eine Gruppe von Patienten, die an einer Borreliose erkrankt sind, anhand der Krankheitsstadien in Untergruppen aufteilen. Im folgenden sollen die Ergebnisse dieser drei Untergruppen miteinander verlichen werden.

5.2.5.1 Vergleich der klinischen Ergebnisse der Patienten aus den verschiedenen Krankheitsstadien einer Borreliose

Wie oben beschrieben, läßt sich ein Kollektiv von Patienten, die an einer Borreliose erkrankt waren, anhand der Krankheitsstadien in drei Untergruppen aufteilen. Im folgenden sollen die Ergebnisse dieser drei Untergruppen miteinander verglichen werden.

Bei 34 Patienten mit einer symptomatischen Borreliose lagen zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung klinisch Zeichen eines aktiven Krankheitsgeschehens vor. Eine Therapie wurde vor der Erstuntersuchung bei 4 Patienten durchgeführt.

Zum Zeitpunkt der ersten Nachuntersuchung wies keiner der Patienten mehr eine aktive Borreliose auf. Bis zu diesem Zeitpunkt war bei 12 Patienten eine Therapie durchgeführt worden.

<i>Parameter</i>	<i>Patienten des Stadium 1 n = 10</i>	<i>Patienten des Stadium 2 n = 38</i>	<i>Patienten des Stadium 3 n = 14</i>
<i>Alter</i>	M = 54,6 Jahre SD = 14,1	M = 52,1 Jahre SD = 13,6	M = 46,3 Jahre SD = 20,0
<i>Geschlecht</i>	Männer = 0 Frauen = 10	Männer = 17 Frauen = 21	Männer = 6 Frauen = 8

Tabelle 19: Vergleich der Krankheitsstadien anhand des Alters und des Geschlechts

Alle erfaßten Patienten waren, wie Tabelle 19 zeigt, Erwachsene im Alter zwischen 16 und 75 Jahren. Im Stadium 1 der Borreliose wurden ausschließlich Frauen erfaßt, bei den beiden anderen Stadien war der Anteil von Frauen und Männern annähernd gleich groß.

Definitionsgemäß unterschieden sich diese Untergruppen in ihrer klinischen Symptomatik, da durch die Symptomatik die Zuordnung zu diesen Krankheitsstadien erfolgt.

Es bestanden keine Unterschiede in den Konzentrationen der IgG-Subklassen bei den einzelnen Stadien.

5.2.5.2 Vergleich der Ergebnisse in ELISA, IFT und IFT-Abs bei Patienten der verschiedenen Krankheitsstadien einer Borreliose

Die Patienten mit einer symptomatischen Borreliose wiesen, bis auf 6 Patienten, eine positive Borrelien-Serologie auf. Von diesen 6 Patienten litten 5 an einer Neuroborreliose (Stadium 2) mit intrathekaler Antikörperproduktion und einer an einem ECM.

Die Patienten des dritten Erkrankungsstadiums zeigten bei den serologischen Untersuchungen im Rahmen der Erstuntersuchung signifikant höhere Werte beim ELISA und dem IFT-ABS als Patienten des ersten oder zweiten Erkrankungsstadiums. Dies ist nicht überraschend, da diese Patienten sich bis zur Diagnosestellung definitionsgemäß schon mindestens 6 Monate mit dem Erreger auseinander gesetzt hatten. In dieser Gruppe ist die Spannweite der ELISA-Werte besonders groß.

Auch bei der ersten und zweiten Nachuntersuchung wurde bei den Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 signifikant höhere ELISA-Werte gemessen als bei Patienten der beiden anderen Krankheitsstadien.

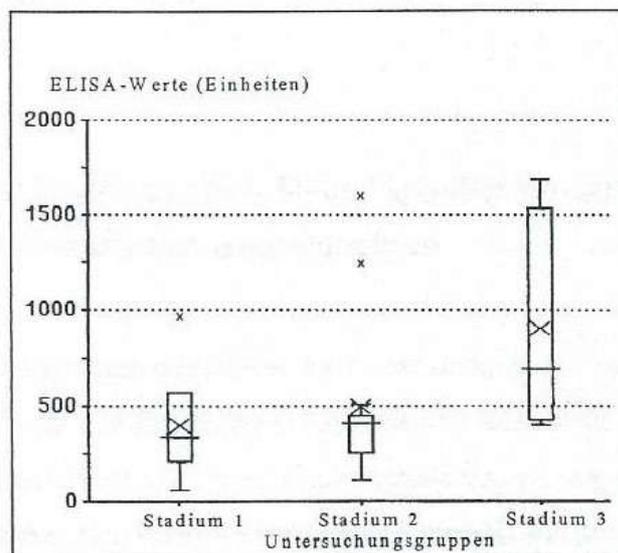


Abbildung 26: ELISA-Werte bei der Erstuntersuchung nach den Krankheitsstadien geordnet

- = Median, X = Mittelwert

Wie Abbildung 26 zeigt, lagen sowohl der Median, als auch der Mittelwert der ELISA-Werte bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 bei der Erstuntersuchung deutlich höher als die entsprechenden Werte bei Patienten im Stadium 1 und 2. Zusätzlich sind die

ELISA-Werte weiter gestreut als im Stadium 1 und 2, was in Abbildung 25 durch die Größe der Box, sowie der Whisker dargestellt wird.

Dieser Unterschied tritt auch beim IFT- und IFT-Abs-Wert auf. Auch bei diesen Parametern wiesen Patienten im Stadium 3 höhere Werte auf und ihre Werte sind weiter gestreut. Im Vergleich mit Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 lagen auch die IFT- und die IFT-ABS-Werte bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 signifikant höher.

Dies ist in der Abbildung 27 dargestellt.

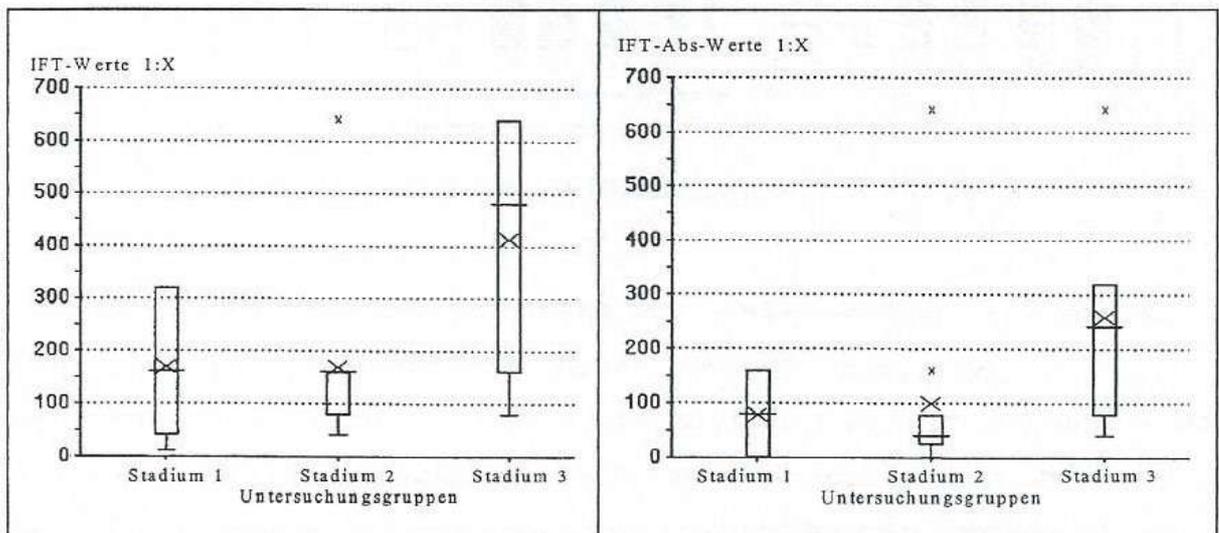


Abbildung 27: Vergleich der Krankheitsstadien anhand des IFT- und IFT-Abs-Wertes zum Zeitpunkt der ersten Nachuntersuchung

5.2.5.3 Vergleich der Ergebnisse im IgM- und IgG-Westernblot bei Patienten der verschiedenen Krankheitsstadien einer Borreliose

Alle symptomatischen Patienten wiesen bei der Untersuchung des Serums im Westernblot entsprechend der Kriterien von Engelsing (1995) positive Befunde auf.

Betrachtete man die Häufigkeit mit der einzelne Partialantigene von Patientenantikörpern erkannt wurden, so fanden sich beim Vergleich der Patienten aus den verschiedenen Krankheitsstadien im Fisher-Test folgende signifikanten Unterschiede.

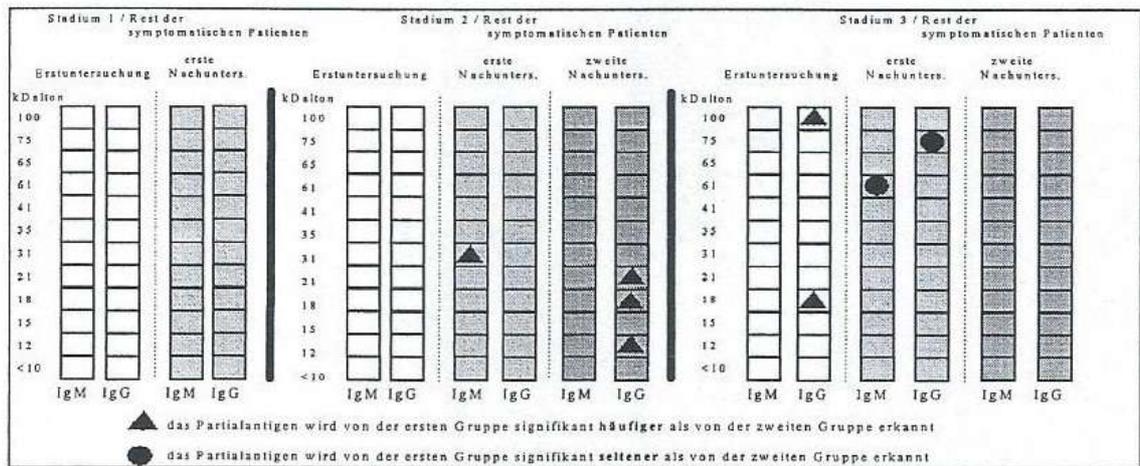


Abbildung 28: statistischer Vergleich der IgM- und IgG-Blotergebnisse der verschiedenen Krankheitsstadien

Bei der Erstuntersuchung wiesen Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 signifikant häufiger IgG-Antikörper gegen das 100- und 18-k Dalton-Partialantigen auf.

Bei der ersten Nachuntersuchung erkannten Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 das 31-k Dalton-Antigen signifikant häufiger mit IgM als bei den beiden anderen Stadien.

Im Rahmen der zweiten Nachuntersuchung wiesen Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 signifikant häufiger IgG-Antikörper gegen das 21-, 18- und 12 k Dalton-Antigen auf als der Rest der symptomatischen Patienten.

5.2.5.4 Vergleich der Ergebnisse im IgG-Subklassen-Blot bei Patienten der verschiedenen Krankheitsstadien einer Borreliose

Beim Vergleich der Patienten der einzelnen Krankheitsstadien anhand der IgG-Subklassendominanz ließen sich folgende Unterschiede beobachten:

1. Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1 und 3 wiesen bei der Erstuntersuchung überwiegend eine IgG1-Dominanz auf, während eine IgG3-Dominanz nur selten beobachtet wurde.
2. Bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 lag schon bei der Erstuntersuchung signifikant häufiger eine IgG3-Dominanz ($p = 0,0155$) und signifikant seltener eine IgG1-Dominanz vor ($p = 0,0100$) als bei den Patienten im Stadium 1 und 3 der Borreliose.
3. Bei allen Patienten nahm im zeitlichen Verlauf die Häufigkeit der IgG1-Dominanz ab und die Häufigkeit der IgG3-Dominanz zu.

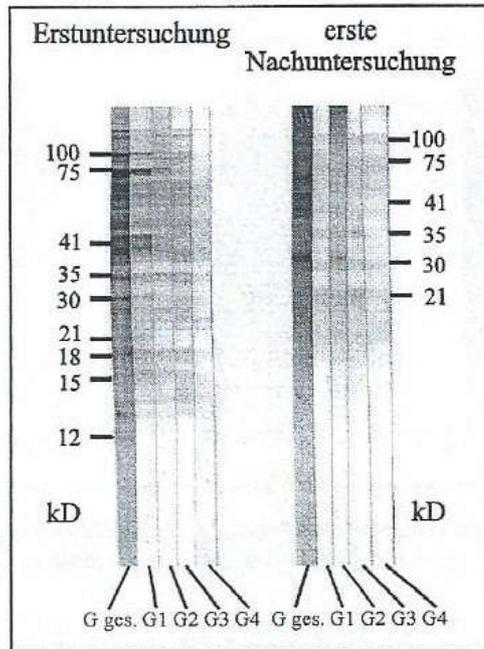


Abbildung 29: Darstellung des IgG-Subklassenblots einer Patientin mit einer Borreliose im Stadium 1
Gges. = IgG gesamt, G1 = IgG1, G2 = IgG2, G3 = IgG3, G4 = IgG4

In Abbildung 29 ist der IgG-Subklassen-Blot einer Patientin mit symptomatischer Borreliose im Stadium 1 dargestellt. Bei der Erstuntersuchung wies die Patientin eine IgG1-Dominanz auf, bei der ersten Nachuntersuchung eine IgG3-Dominanz.

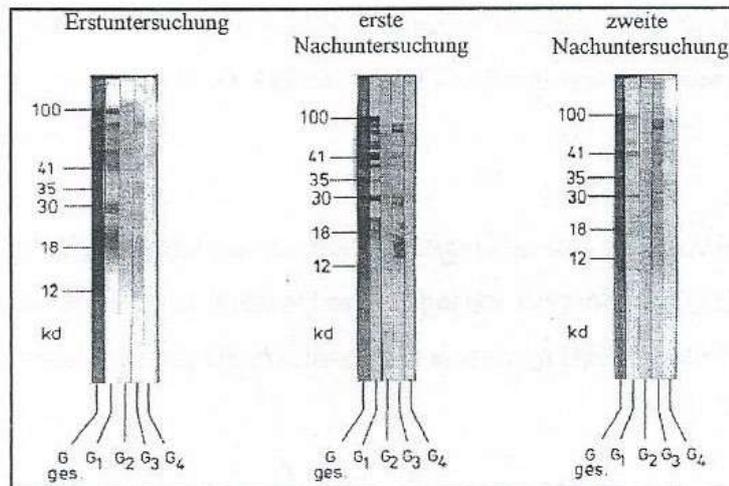


Abbildung 30: Darstellung des IgG-Subklassenblots eines Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2
Gges. = IgG gesamt, G1 = IgG1, G2 = IgG2, G3 = IgG3, G4 = IgG4

In Abbildung 30 ist der IgG-Subklassen-Blot eines Patientin mit symptomatischer Borreliose im Stadium 2 dargestellt. Bei der Erstuntersuchung wies dieser Patient eine IgG1-Dominanz auf, bei der ersten Nachuntersuchung eine IgG1+3-Kodominanz und bei der zweiten Nachuntersuchung eine IgG3-Dominanz.

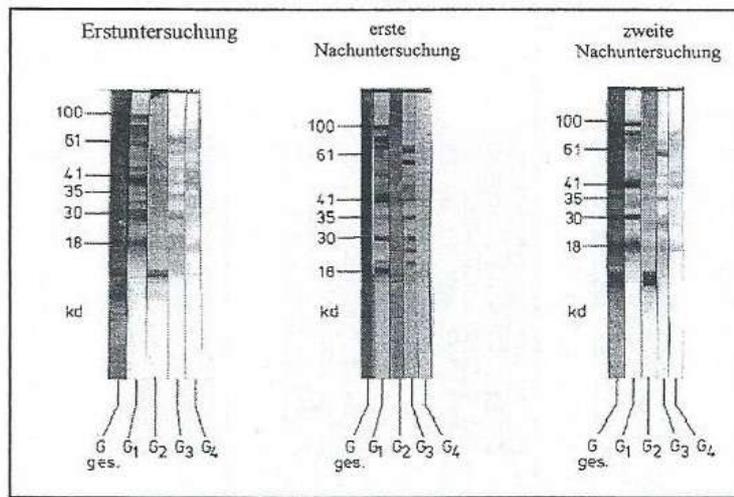


Abbildung 31: Darstellung des IgG-Subklassenblots einer Patientin mit einer Borreliose im Stadium 3
 Gges. = IgG gesamt, G1 = IgG1, G2 = IgG2, G3 = IgG3, G4 = IgG4

Abbildung 31 zeigt den IgG-Subklassen-Blot einer Patientin mit einer symptomatischen Borreliose im Stadium 3. Sie wies bei allen Untersuchungen eine IgG1-Dominanz auf.

Bei Patienten im Stadium 3 lag bei der Erstuntersuchung signifikant häufiger eine IgG1-Dominanz vor als bei den Patienten der beiden anderen Krankheitsstadien. Demgegenüber lag bei den Patienten des Stadium 3 eine IgG3-Dominanz signifikant seltener vor. Bei der ersten und zweiten Nachuntersuchung konnten zwischen den Krankheitsstadien keine signifikanten Unterschiede bezüglich der IgG-Subklassen-Dominanz mehr nachgewiesen werden.

Verglich man die Häufigkeit, mit der die Partialantigene in den verschiedenen Stadien erkannt wurde, so fanden sich im Fisher-Test nur bei der Erstuntersuchung und der ersten Nachuntersuchung signifikanten Unterschiede bei einzelnen Banden (Abbildung 32).

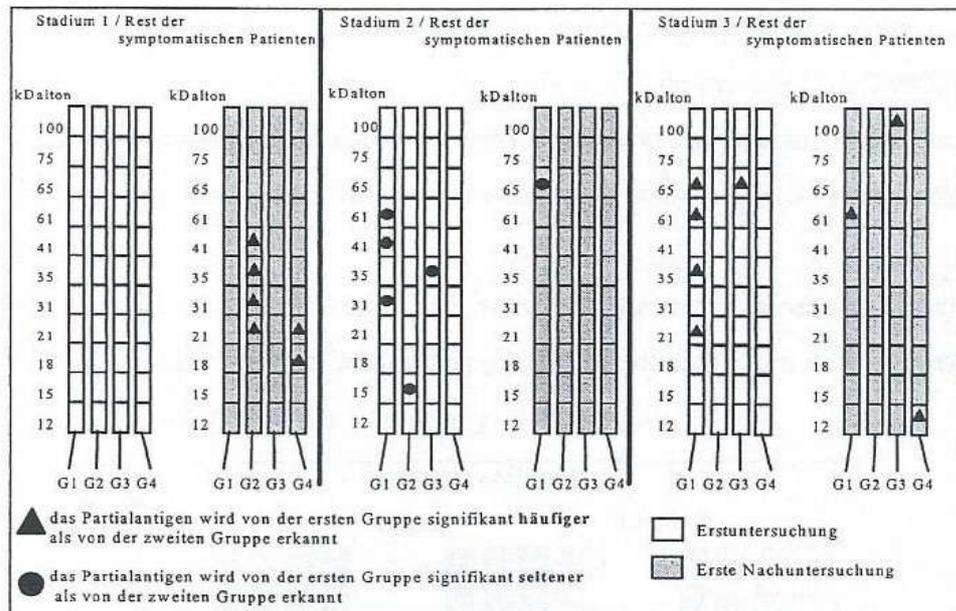


Abbildung 32: Statistischer Vergleich der Häufigkeiten, mit denen Partialantigene von IgG-Subklassen-antikörpern bei Patienten der verschiedenen Krankheitsstadien erkannt wurden G1: IgG1-Antikörper; G2: IgG2-Antikörper; G3: IgG3-Antikörper; G4: IgG4-Antikörper

Patienten im Stadium 1 erkannten kein Partialantigen signifikant häufiger oder seltener, als die anderen symptomatischen Patienten.

Patienten im Stadium 2 erkannten bei der Erstuntersuchung mit IgG1-Antikörpern das 61-, 41- und 31-k Dalton-Partialantigen mit IgG2-Antikörpern das 15-k Dalton-Partialantigen und mit IgG3-Antikörpern das 31-k Dalton-Partialantigen signifikant seltener als die anderen symptomatischen Patienten. Bei der ersten Nachuntersuchung erkannten sie mit IgG1-Antikörpern das 65-kDalton-Partialantigen signifikant seltener als die anderen symptomatischen Patienten.

Patienten im Stadium 3 erkannten bei der Erstuntersuchung mit IgG1-Antikörpern das 65-, 61-, 35- und 21-k Dalton-Partialantigen, mit IgG3-Antikörpern das 65-k Dalton-Partialantigen signifikant häufiger als die anderen symptomatischen Patienten. Bei der ersten Nachuntersuchung erkannten sie mit IgG1-Antikörpern das 61-k Dalton-Partialantigen, mit IgG3-Antikörpern das 100-k Dalton-Partialantigen und mit IgG4-Antikörpern das 12-k Dalton-Partialantigen signifikant häufiger als die anderen symptomatischen Patienten.

Im Rahmen der zweiten Nachuntersuchung fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit, mit der einzelne Partialantigene erkannt wurden.

Da die IgG-Subklassendominanz sich im Verlauf der Erkrankung bei den symptomatischen Patienten änderte, ergab sich die Frage, ob diese Unterschiede bei den IgG-Subklassendominanzen auf Unterschieden in der Antigenerkennung beruhten, also, ob bei der Erstuntersuchung und den beiden Nachuntersuchungen unterschiedliche Partialantigene erkannt wurden.

Um diese Frage zu klären, wurde verglichen, welche Partialantigene bei den einzelnen Untersuchungszeitpunkten in der Gesamtgruppe der symptomatischen Patienten erkannt wurden. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 33 dargestellt.

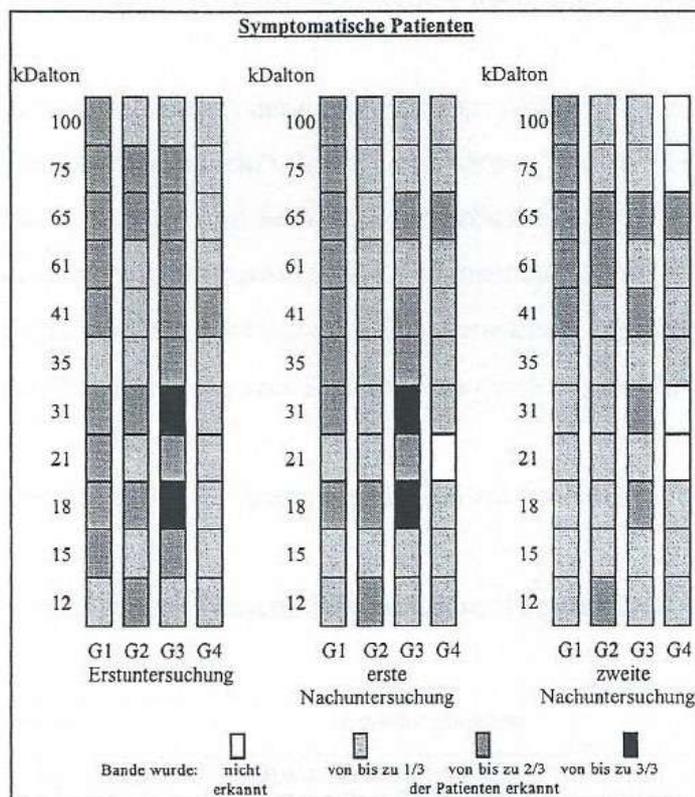


Abbildung 33: Vergleich der erkannten Partialantigenen im IgG-Subklassenblot bei symptomatischen Patienten zu den drei Untersuchungszeitpunkten; G1: IgG1-Antikörper, G2: IgG2-Antikörper; G3: IgG3-Antikörper, G4: IgG4-Antikörper

Insgesamt war zu beobachten, daß kein Antigen ausschließlich von Antikörpern einer IgG-Subklasse erkannt wurde. Im zeitlichen Verlauf änderte sich die Häufigkeit, mit der einzelne Partialantigene erkannt wurden nicht sehr. Der Wechsel der IgG-Subklassendominanzen wurde somit nicht durch eine Änderung im Antikörperspektrum verursacht.

Es fiel aber auf, daß einzelne Antigene unabhängig vom Krankheitsstadium und vom Untersuchungszeitpunkt in einer IgG-Subklasse besonders oft erkannt wurden. So wurde das 100-kDalton Antigen besonders oft von IgG1-Antikörpern, das 12-kDalton Antigen von IgG2-Antikörpern und das 31- und 18-kDalton Antigen von IgG3-Antikörpern erkannt.

5.3 Darstellung der klinischen und serologischen Ergebnisse der asymptomatischen Patientengruppe, im Querschnitt und im Verlauf

5.3.1 Klinische Ergebnisse der asymptomatischen Patienten

In diese Studie wurden insgesamt 34 Personen mit einem positiven Antikörpernachweis im ELISA und Westernblot aufgenommen, die aber keine Symptome einer Borrelien-Infektion zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung oder anamnestisch gesichert aufwiesen. Entsprechend der Definition unter Punkt 2.1. wiesen diese Patienten damit eine asymptomatische Borrelien-Infektion auf.

Bei diesen Personen war im Rahmen der diagnostischen Abklärung einer anderen Grunderkrankung nebenbefundlich ein erhöhter Antikörper-Titer gegen *Borrelia burgdorferi* aufgefallen, ohne daß Symptome und Serologie in Verbindung miteinander gebracht werden konnten. Durch neurologische, dermatologische und rheumatologische Untersuchungen wurde eine aktive Borreliose ausgeschlossen. Diese Personengruppe diente als seropositive Kontrolle ohne Krankheitsaktivität gegenüber der Gruppe der symptomatischen Patienten.

In dieser Gruppe befanden sich 19 Männer und 15 Frauen im Alter von 16 bis 71 Jahren, im Mittel von 53,8 Jahren.

Die Probanden wiesen folgende klinische Diagnosen auf (Tabelle 20):

<i>Symptomgruppen</i>	<i>Leitdiagnosen</i>
<i>neurologische Symptomatik</i>	Carpaltunnelsyndrom (1), periphere Neuropathie (3), Wurzelkompressionssyndrom (2), funktionelle Lähmung (1)
<i>dermatologische Symptomatik</i>	Kontaktexzem (2), Psoriasis vulgaris (1), Exanthem (1)
<i>rheumatologische Symptomatik</i>	traumatischer Kniegelenkserguß (1), degenerative Gelenkerkrankungen (2), rheumatoide Arthritis (2)
<i>Symptome im Bereich von Hals, Nasen und Ohren</i>	kongenitaler Nystagmus (1), M.Ménière (1), Cochleovestibuläre Läsion (1), Hörsturz (1), Otitis media (1)
<i>sonstige Symptomatik</i>	Depression (2), Fieber unklarer Genese (1), Lymphadenopathie (1), Fußödem (1), Hämangiom (1)

Tabelle 20: Klinische Symptomatik der Patienten mit asymptomatischer Borreliose

Eine aktive Borreliose wurde durch die klinische Diagnostik ausgeschlossen. Anamnestisch konnten keine Symptome einer früheren Borreliose ermittelt werden.

Zum ersten Untersuchungszeitpunkt wurden 29 der 34 Personen mit asymptomatischer Borrelien-Infektion erfaßt. Dabei waren 12 Frauen und 17 Männer, die im Durchschnitt 56 Jahre alt waren. Bei 6 der erfaßten Probanden lag bei der Erstuntersuchung eine aktive entzündliche Erkrankung anderer Genese vor (unklare BSG-Erhöhung, Arthritis, rheumatoide Arthritis, Otitis media, Psoriasis vulgaris, Fieber unklarer Genese). Bei zwei Patienten wurde wegen Mamma-Ca, beziehungsweise aplastischer Anämie eine Immunsuppression durchgeführt. Insgesamt wurden 12 Probanden mit neurologischen, 6 mit dermatologischen, 3 mit rheumatologischen und 8 mit sonstigen Symptomen untersucht.

Im Rahmen der ersten Nachuntersuchung wurden 6 asymptomatische Probanden, drei Frauen und drei Männer im Alter von durchschnittlich 54 Jahren erfaßt.

In der zweiten Nachuntersuchung wurden 8 Probanden erfaßt. Dabei waren zwei Frauen und sechs Männer im Alter von durchschnittlich 48,9 Jahren.

5.3.2 Ergebnisse der IgG-Subklassen Nephelometrie bei asymptomatischen Patienten

Bei dieser Personengruppe ergab die IgG-Subklassen Nephelometrie folgende Ergebnisse:

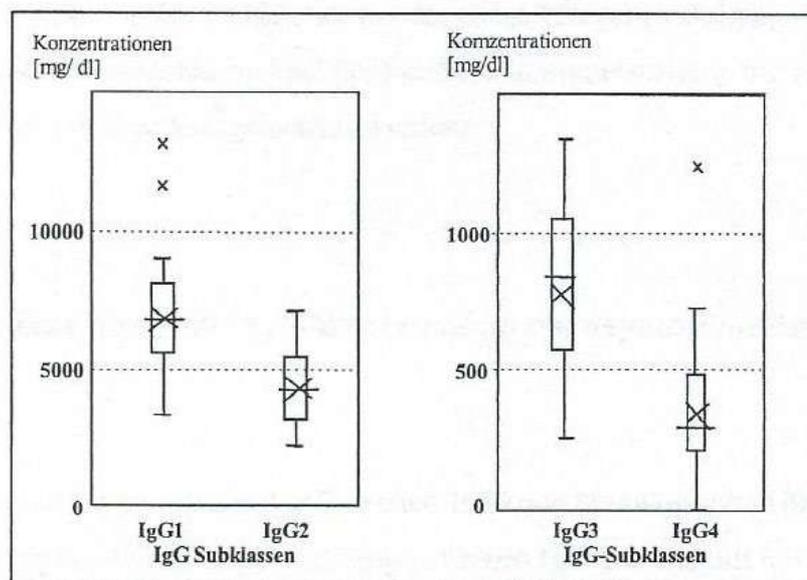


Abbildung 35: Ergebnisse der IgG-Subklassen Nephelometrie aller asymptomatischer Probanden

Es wurde bei einer Probandin ein IgG4-Defizit festgestellt, daher wurde sie von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Im übrigen entsprachen bei Probanden mit asymptomatischer Borrelien-Infektion die IgG-Subklassenkonzentrationen der Verteilung bei gesunden Erwachsenen (Hamilton 1987), ebenso bei den Probanden der Untergruppen die im Rahmen der Erstuntersuchung sowie der ersten und zweiten Nachuntersuchung erfaßt wurden.

5.3.3 Ergebnisse des ELISA, IFT und IFT-Abs bei asymptomatischen Patienten

Bei allen Probanden mit asymptomatischer Borrelieninfektion fanden sich positive Befunde in der Borrelien-Serologie.

So lagen die durchschnittlichen Ergebnisse im ELISA bei rund 400 Einheiten (maximal:1378 Einheiten, minimal: 204 Einheiten), im IFT bei einem Titer von 1:215 und im IFT-Abs bei 1:93.

Bei den Nachuntersuchungen asymptomatischer Borrelien-Infizierter gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des ELISA, IFT und IFT-Abs gegenüber der Gruppe bei der Erstuntersuchung. Als Trend war zu beobachten, daß die Antikörperkonzentrationen abnahm. So zum Beispiel im ELISA, wo bei der ersten Nachuntersuchung ebenfalls 400 Einheiten im Durchschnitt und bei der zweiten Nachuntersuchung nur noch 260 Einheiten im Durchschnitt gemessen wurden.

5.3.4 Ergebnisse des IgM- / IgG-Westernblots bei asymptomatischen Patienten

Bei Probanden mit asymptomatischer Borrelien-Infektion überwog schon bei der Erstuntersuchung die Anzahl der borrelienspezifischen IgG-Banden mit 6,6 IgG-Banden pro Patient gegenüber 3,0 IgM-Banden pro Patient.

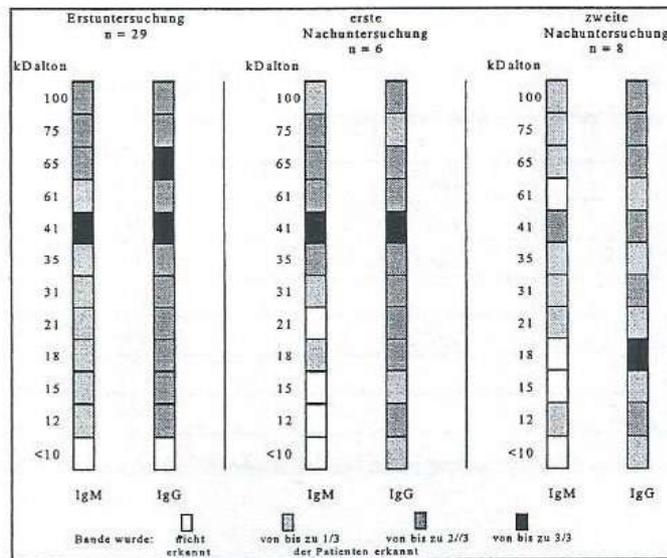


Abbildung 36: Häufigkeiten von IgM- bzw. IgG-Antikörperbanden im Immunoblot bei Patienten mit asymptomatischer Borrelien-Infektion zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

Im IgM-Blot wurden, wie Abbildung 36 zeigt, besonders höhermolekulare Antigene wie das 100-, 75- und 65-k Dalton Antigen erkannt. Das 41kDalton-Antigen (Flagellin) wurde sowohl im IgM- wie auch im IgG-Blot oft markiert.

Gegen alle anderen Antigene fanden sich ebenfalls Antikörper, wenn auch mit geringerer Häufigkeit.

Im IgG-Blot fand sich ein breites Spektrum von Antikörpern, die fast alle Borrelien-Partialantigene markierten.

Bei der ersten Nachuntersuchung wurde wiederum das 41-kDalton Partialantigen am häufigsten erkannt. Das Antikörpermuster hatte sich gegenüber der Erstuntersuchung kaum verändert. Im IgM-Blot wurden niedermolekulare Antigene seltener erkannt so das 21-, 15- und 12-k Dalton Antigen.

Im Rahmen der zweiten Nachuntersuchung beschränkte sich das IgM-Antikörperspektrum im wesentlichen auf Antikörper gegen das 41-kDalton-Antigen. Die Häufigkeit und Intensität der Banden im IgG-Blot nahm ab. Trotzdem wurde insbesondere das 18-kDalton-Antigen von 6 der 8 Probanden erkannt.

5.3.5 Ergebnisse des IgG-Subklassen-Blots asymptomatischen Patienten

Auch bei Probanden mit asymptomatischer Borrelien-Infektion wurde für jeden IgG-Subklassen-Blot die Anzahl und Intensität der Banden ausgewertet. Die Subklasse mit den meisten und stärksten Banden wurde dominierend genannt.

In der Tabelle 21 ist für jeden Untersuchungszeitpunkt dargestellt, bei wievielen Probanden Antikörper in einer IgG-Subklasse dominierten.

<i>Dominanzen</i>	<i>Erstuntersuchung</i> <i>n = 29</i>	<i>erste</i> <i>Nachuntersuchung</i> <i>n = 6</i>	<i>zweite</i> <i>Nachuntersuchung</i> <i>n = 8</i>
<i>IgG1</i>	4 (14%)	1 (17%)	
<i>IgG2</i>	3 (10%)	1 (17%)	1 (12%)
<i>IgG3</i>	15 (52%)	2 (33%)	4 (50%)
<i>IgG4</i>	1 (3%)		
<i>IgG1+IgG3</i>	3 (10%)	2 (33%)	1 (12%)
<i>IgG2+IgG3</i>	2 (7%)		1 (12%)
<i>keine Dominanz</i>	1 (3%)		1 (12%)

Tabelle 21: IgG-Subklassendominanz bei Probanden mit asymptomatischer Borrelien-Infektion

Eine IgG1-Dominanz findet sich bei der Erstuntersuchung nur bei wenigen Probanden eine IgG3-Dominanz ist weit häufiger. Zudem sind häufig Kodominanzen zu beobachten.

Patienten mit entzündlichen Erkrankungen unterschieden sich hinsichtlich der IgG-Subklassendominanz nicht von den übrigen asymptomatischen Probanden.

Bei den Nachuntersuchungen blieb IgG3 die dominierende Subklasse, während eine IgG1-Dominanz bei der zweiten Nachuntersuchung nicht mehr auftrat.

In der Abbildung 37 sind die IgG-Subklassen-Blots dreier asymptomatischer Probanden dargestellt.

Alle drei wiesen eine deutliche IgG3-Dominanz auf.

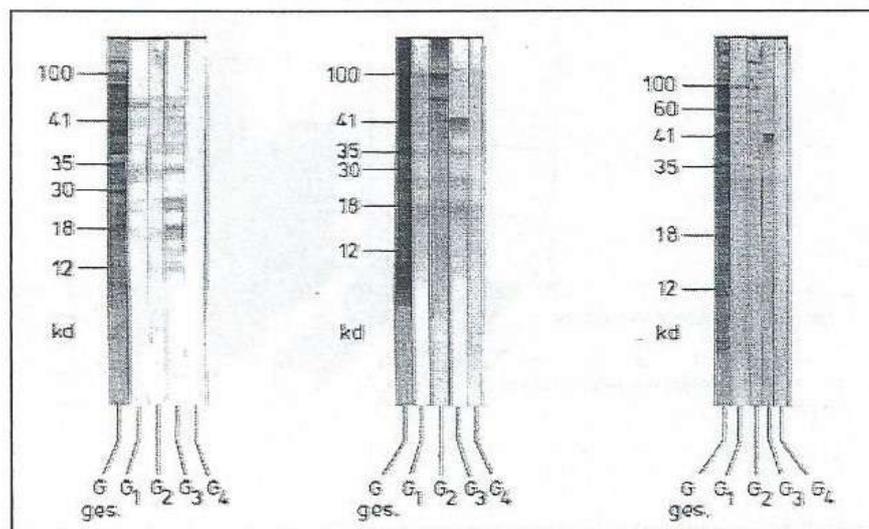


Abbildung 37: Darstellung der IgG-Subklassenblots dreier asymptomatischer Patienten

5.4 Vergleich der Ergebnisse der Probanden mit symptomatischer und asymptomatischer Borrelien-Infektion

Die symptomatischen Patienten und die asymptomatischen Probanden wurden für jeden Untersuchungszeitpunkt getrennt miteinander verglichen, da während der Verlaufskontrollen jeweils nur ein Teil der Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten im Krankheitsverlauf erfaßt wurde.

Zunächst wurde die Gruppe aller symptomatischer Patienten und der asymptomatischen Probanden hinsichtlich der IgG-Subklassen-Konzentration miteinander verglichen, um auszuschließen, daß Unterschiede bei den spezifischen IgG-Subklassen auf Unterschieden in der IgG-Subklassenkonzentrationen beider Gruppen beruhten.

Dabei zeigte sich, daß die Konzentration an IgG1- und IgG2-Antikörpern bei asymptomatischen Patienten signifikant höher waren ($p < 0,05$) als bei symptomatischen Patienten. Bei den IgG3- und IgG4-Antikörpern gab es keine signifikanten Konzentrationsunterschiede (vergleiche Abbildung 38).

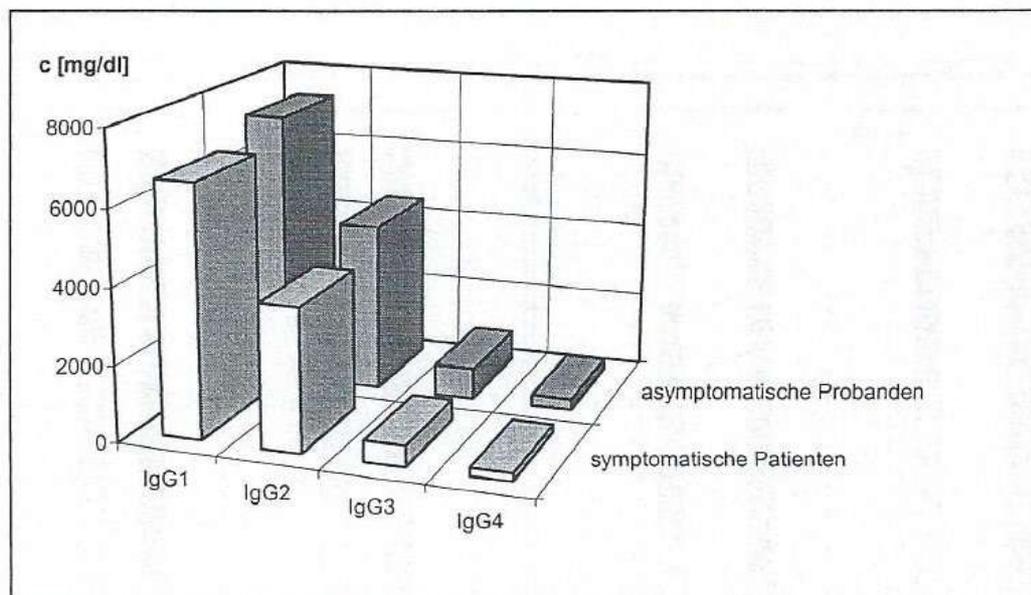


Abbildung 38: Vergleich der Konzentrationen der IgG-Subklassen bei symptomatischen Patienten und Probanden mit asymptomatischer Borreliose

5.4.1 Vergleich von Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1 und asymptomatischen Probanden

5.4.1.1 Vergleich der klinischen, der nephelometrischen und der serologischen Ergebnisse bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1 und Probanden mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion

Die Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1 litten in dieser Studie ausschließlich an einem ECM, während bei den asymptomatischen Probanden sehr unterschiedliche Krankheitsbilder vorlagen.

Bei der Geschlechtsverteilung ergaben sich beim Vergleich der beiden Gruppen signifikante Unterschiede, da bei den Patienten des Stadium 1 nur Frauen erfaßt wurden.

Es fanden sich keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen beim Vergleich des Alters, der IgG-Subklassenmenge und der ELISA-, IFT und IFT-Abs-Ergebnisse.

5.4.1.2 Vergleich der IgM- und IgG-Blot-Ergebnisse bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1 und Probanden mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion

Abbildung 39 stellt die Häufigkeiten der IgM- beziehungsweise IgG-Antikörper-Banden bei Patienten im Stadium 1 der Borreliose und bei Probanden mit asymptomatischer Borreliose einander gegenüber.

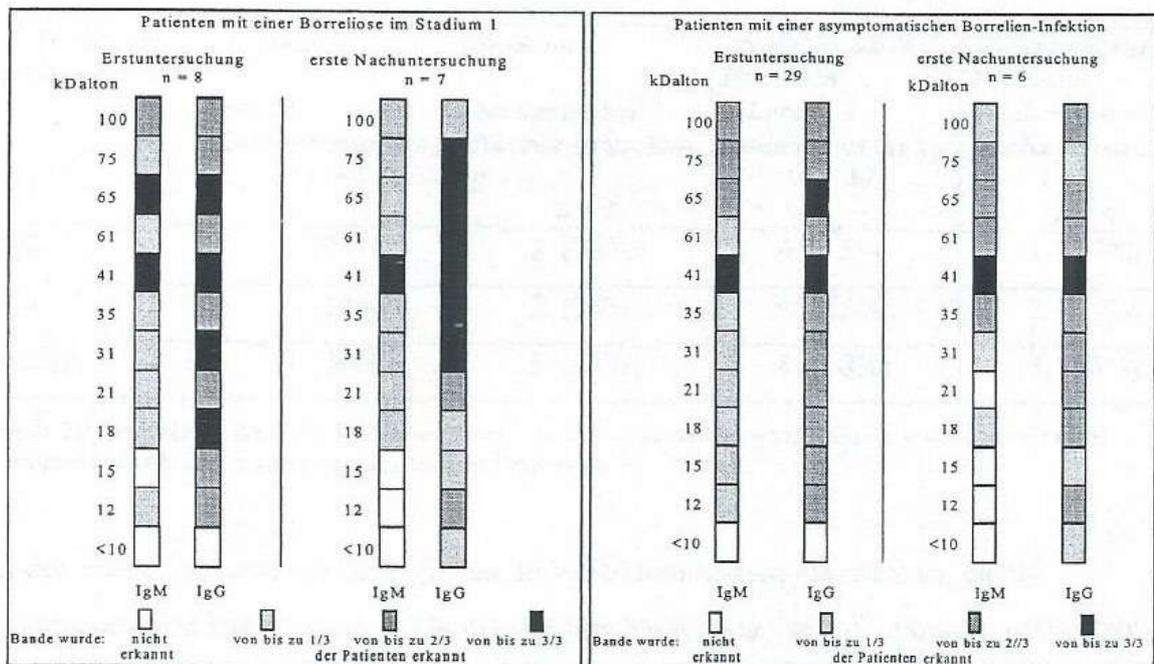


Abbildung 39: Häufigkeit der IgM- und IgG-Antikörper-Banden bei Patienten mit Borreliose im Stadium 1 und asymptomatischer Borrelien-Infektion

Bei beiden Gruppen überwog bei der Untersuchung die Anzahl der spezifischen IgG-Antikörper gegenüber den spezifischen IgM-Antikörpern.

Bei Patienten im Stadium 1 lagen bei der Erstuntersuchung häufiger IgM-Antikörper gegen das 65-k Dalton-Antigen vor, dagegen seltener gegen das 75- und 15-k Dalton-Antigen als bei asymptomatischen Probanden.

Im IgG-Blot wurden von Patienten im Stadium 1 das 31- und 18-k Dalton-Antigen häufiger erkannt.

Bei der ersten Nachuntersuchung hatte in beiden Gruppen die Anzahl der IgM-Antikörper-Banden abgenommen, im IgG-Blot wurden von Patienten im Stadium 1 das 75-, 65-, 35- und 31-k Dalton-Antigen häufiger als von asymptomatischen Probanden erkannt.

5.4.1.3 Vergleich der IgG-Subklassen-Blot-Ergebnisse bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1 und Probanden mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion

Bei den Patienten mit einer symptomatischen Borreliose im Stadium 1 wiesen 37,5 % bei der Erstuntersuchung eine IgG1-Dominanz auf, während bei den Probanden mit asymptomatischer Borrelien-Infektion nur bei 14,8 % diese Subklasse dominierte. Auf der anderen Seite war eine IgG3-Dominanz nur bei 12,3 % der symptomatischen Patienten, aber bei 55,6 % der asymptomatischen Probanden beobachtet worden. (vergleiche Tabelle 22).

<i>IgG-Subklassen-Dominanz</i>	<i>Stadium 1 bei der Erstuntersuchung n = 8</i>	<i>Stadium 1 bei der ersten Nachuntersuchung n = 7</i>	<i>asymptomatische Patienten bei der Erstuntersuchung n = 27</i>	<i>asymptomatische Patienten bei der ersten Nachuntersuchung n = 6</i>
IgG1	3 (38%)	2 (28%)	4 (15%)	1 (17%)
IgG3	1 (13%)	2 (28%)	15 (55%)	2 (33%)
sonstige	4 (50%)	3 (43%)	8 (30%)	3 (50%)

Tabelle 22: Darstellung der IgG-Subklassendominanz im Vergleich symptomatischer Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1 und asymptomatischen Probanden

Bei der ersten Nachuntersuchung glichen sich die Dominanzen einander an, da bei symptomatischen Patienten im Stadium 1 weniger häufig eine IgG1-Dominanz, dafür aber häufiger eine IgG3-Dominanz zu beobachten war, während bei asymptomatischen Patienten das Verhältnis gleich geblieben war.

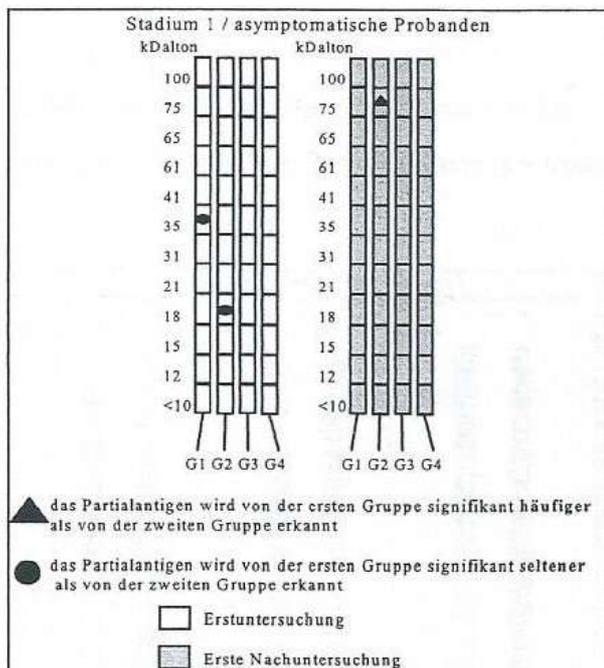


Abbildung 40: Statistischer Vergleich der IgG-Subklassenblot-Ergebnisse zwischen Patienten im Stadium 1 und asymptomatischen Probanden

Verglich man welche Partialantigene von beiden Gruppen erkannt wurde, so wurde zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung von asymptomatischen Probanden signifikant häufiger das 35-kDalton-Partialantigen mit Antikörpern der IgG1-Subklasse. Diese Unterschiede ließen sich bei der Nachuntersuchung nicht mehr nachweisen.

5.4.2 Vergleich von Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 und asymptomatischen Probanden

5.4.2.1 Vergleich der klinischen und epidemiologischen Ergebnisse, der IgG-Subklassen-Nephelometrie und der ELISA-, IFT- und IFT-ABS-Ergebnisse bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 und Probanden mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion

Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 litten über wiegend an einer Neuroborreliose, daneben waren 3 Patienten an einer Lyme-Arthritis erkrankt.

Demgegenüber waren bei Probanden mit asymptomatischer Borrelien-Infektion viele unterschiedliche Krankheitsbilder diagnostiziert worden.

Beim Vergleich der Patienten im Stadium 2 mit den Probanden mit asymptomatischer Borrelien-Infektion fanden sich keine signifikanten Unterschiede beim Alter, der Geschlechtsverteilung, der IgG-Subklassenmenge, der Ergebnisse im ELISA, IFT und IFT-Abs.

5.4.2.2 Vergleich der IgM- und IgG-Blot-Ergebnisse bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 und Probanden mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion

In Abbildung 41 sind die Ergebnisse der IgM- und IgG-Immunoblots für Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 und für asymptomatische Probanden im Vergleich dargestellt.

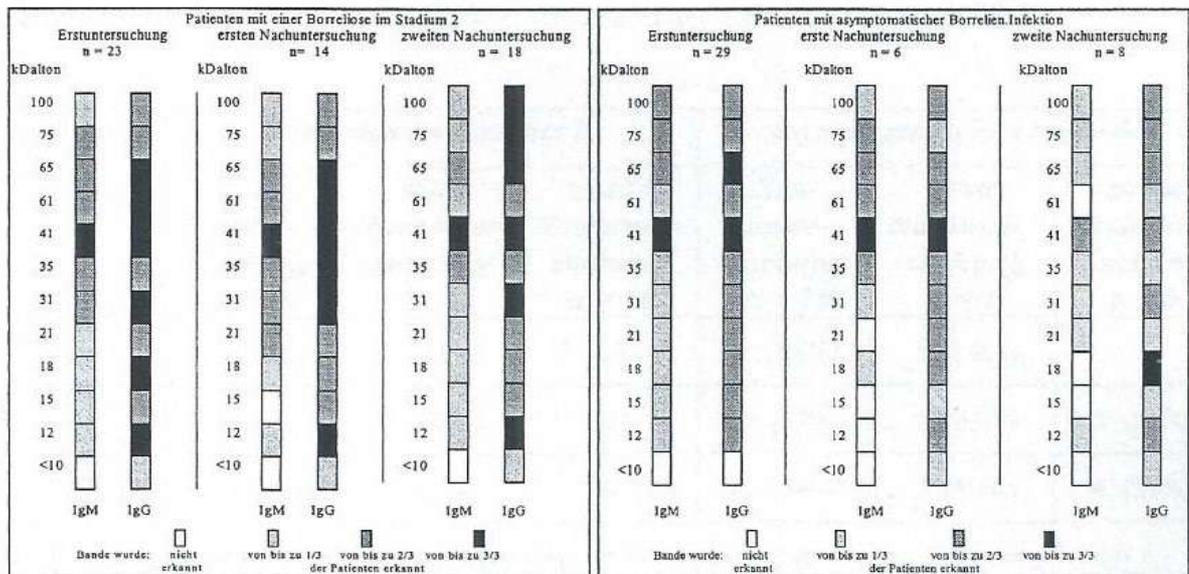


Abbildung 41: Häufigkeit der IgM- und IgG-Antikörper-Banden bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 und asymptomatischen Probanden

Beim Vergleich der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 mit Probanden mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion fiel als Gemeinsamkeit auf, daß beide Gruppen das 41-k Dalton-Partialantigen sehr häufig erkannten. Demgegenüber wiesen Patienten im Stadium 2 mehr IgM- und IgG-Antikörper gegen borrelienspezifische Partialantigene auf als Probanden mit asymptomatischer Borrelien-Infektion.

Im IgG-Blot wurde bei der Erstuntersuchung das 61-, 31-, 18- und 12-k Dalton-Antigen häufiger von den symptomatischen Patienten erkannt. Bei den beiden Nachuntersuchungen wiesen symptomatische Patienten ebenfalls mehr IgG-Antikörper gegen borrelienspezifische Partialantigene auf als Probanden mit asymptomatischer Borrelien-Infektion, so gegen das 65-, 61-, 35-, 31- und 12-k Dalton-Antigen bei der ersten Nachuntersuchung und gegen das 100-, 75-, 65-, 31- und 12-k Dalton Antigen bei der zweiten Nachuntersuchung.

5.4.2.3 Vergleich der IgG-Subklassen-Blot Ergebnisse von Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 mit Probanden mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion

Beim Vergleich von Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 und Probanden mit asymptomatischer Borrelien-Infektion bezüglich der IgG-Subklassen ließen sich keine eindeutigen Unterschiede nachweisen.

Beide Gruppen wiesen am häufigsten eine IgG3-Dominanz auf, während eine IgG1-Dominanz nur selten nachzuweisen war. Dies ist in der Tabelle 23 dargestellt.

Dominanz	Patienten im Stadium 2			asymptomatische Probanden		
	Erst- unter- suchung n = 23	erste Nachunter- suchung n = 15	zweite Nachunter- suchung n = 18	Erst- unter- suchung n = 29	erste Nachunter- suchung n = 6	zweite Nachunter- suchung n = 8
IgG1	5 (22%)	5 (33%)	3 (17%)	4 (14%)	1 (17%)	0
IgG3	10 (47%)	9 (60%)	15 (83%)	15 (52%)	2 (33%)	4 (50%)
Sonstige	6 (28%)	1 (7%)	0	10 (34%)	3 (50%)	4 (50%)

Tabelle 23: Darstellung der IgG-Subklassendominanz im Vergleich symptomatischer Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 und asymptomatischer Probanden

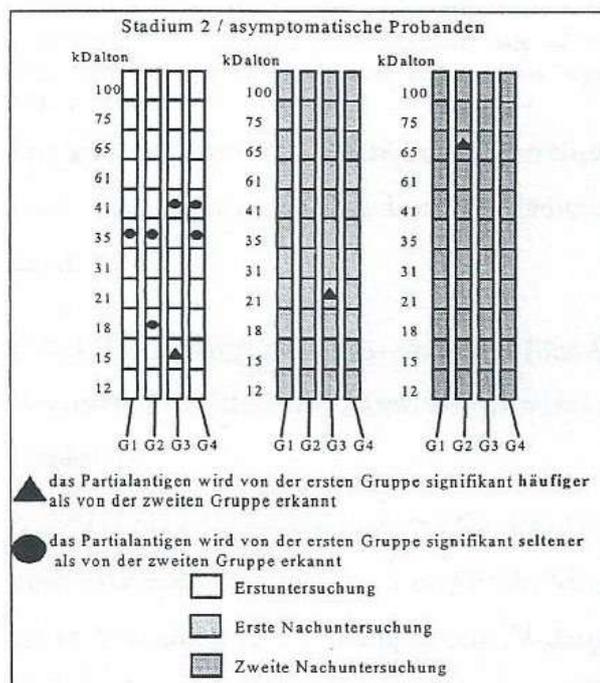


Abbildung 42: statistischer Vergleich der IgG-Subklassenblot-Ergebnisse zwischen Patienten im Stadium 2 und asymptomatischen Probanden

Verglich man welche Partialantigene von beiden Gruppen erkannt wurde, so wurde zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung von asymptomatischen Probanden signifikant häufiger das 35-kDalton-Partialantigen mit IgG1-Antikörpern, das 18-kDalton-Antigen mit Antikörpern der IgG2-Subklasse, sowie das 41-kDalton-Partialantigen mit IgG4-Antikörpern erkannt. Demgegenüber erkannten symptomatische Patienten im Stadium 2 das 15-kDalton-Partialantigen signifikant häufiger mit IgG3-Antikörpern. Diese Unterschiede ließen sich bei der Nachuntersuchung nicht mehr nachweisen.

5.4.3 Vergleich der Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 und asymptomatischen Probanden

5.4.3.1 Vergleich der klinischen und epidemiologischen Ergebnisse, der IgG-Subklassen-Nephelometrie und der ELISA-, IFT- und IFT-ABS-Ergebnisse bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 und Probanden mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion

Beim Vergleich der Patienten im Stadium 3 mit den Probanden mit asymptomatischer Borrelien-Infektion fanden sich keine signifikanten Unterschiede beim Alter, der Geschlechtsverteilung und der IgG-Subklassenmenge.

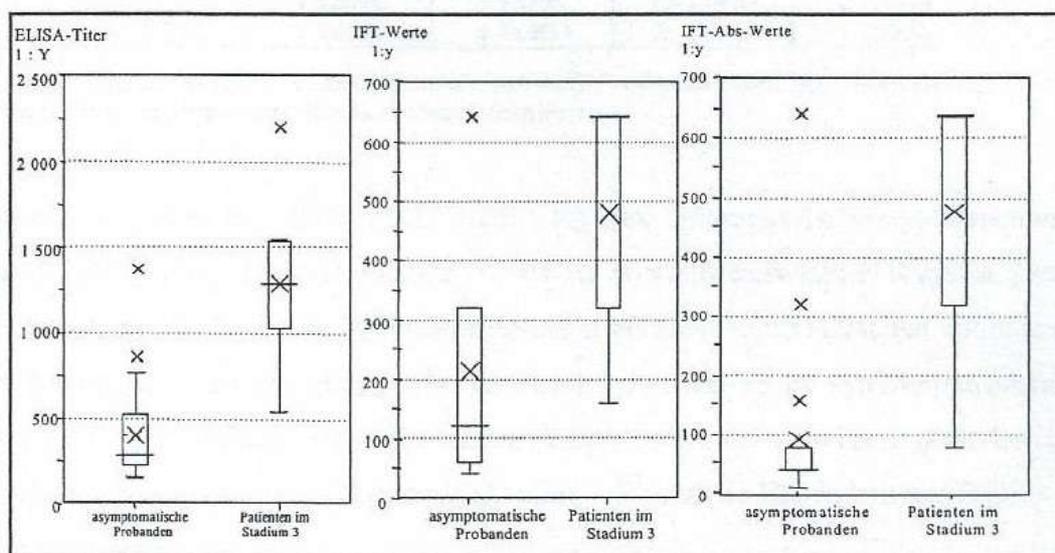


Abbildung 43: Darstellung der Krankheitsdauer, ELISA-, IFT- und IFT-Abs-Werte bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 und Probanden mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion bei der Erstuntersuchung

Die serologischen Ergebnisse in der Borrelien-Serologie lagen im IFT, IFT-Abs und ELISA bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 signifikant höher, wie die Abbildung 39 darstellt.

5.4.3.2 Vergleich der IgM- und IgG-Blot-Ergebnisse bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 und Probanden mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion

Verglich man die Ergebnisse im IgM- beziehungsweise IgG-Immunoblot bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 und Probanden mit einer asymptomatischen Borreliose, wie sie in Abbildung 25 beziehungsweise 36 dargestellt sind, so wurden von den symptomatischen Patienten mit IgG-Antikörpern das 100- und das 12-k Dalton-Partialantigen bei der Erstuntersuchung und das 65- und 61k Dalton-Partialantigen bei den Nachuntersuchungen etwas häufiger erkannt, jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant.

5.4.3.3 Vergleich der IgG-Subklassen-Blot-Ergebnisse bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 und Probanden mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion

In Tabelle 24 wird die Häufigkeit der einzelnen IgG-Subklassendominanzen bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 und bei asymptomatischen Patienten miteinander verglichen.

IgG-Subklassen-Dominanz	Patienten im Stadium 3			asymptomatische Patienten		
	Erstuntersuchung <i>n</i> = 9	erste Nachuntersuchung <i>n</i> = 5	zweite Nachuntersuchung <i>n</i> = 9	Erstuntersuchung <i>n</i> = 27	erste Nachuntersuchung <i>n</i> = 6	zweite Nachuntersuchung <i>n</i> = 8
IgG1	7 (78%)	2 (40%)	2 (22%)	4 (15%)	1 (17%)	0
IgG3	0	1 (20%)	3 (33%)	15 (56%)	2 (33%)	4 (50%)
sonstige	2 (22%)	2 (40%)	4 (44%)	8 (29%)	3 (50%)	4 (50%)

Tabelle 24: Häufigkeit der IgG-Subklassen-Dominanzen bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 und Probanden mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion

Bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 lag zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung signifikant häufiger eine IgG1-Dominanz vor als bei asymptomatischen Probanden. Letztere wiesen signifikant häufiger eine IgG3-Dominanz auf als die symptomatischen Patienten. Bei den Nachuntersuchungen glichen sich die Antikörperspektren der symptomatischen Patienten und der asymptomatische Probanden einander an, indem die Häufigkeit der IgG1-Dominanz bei symptomatischen Patienten abnahm, während die Häufigkeit der IgG3-Dominanz zunahm.

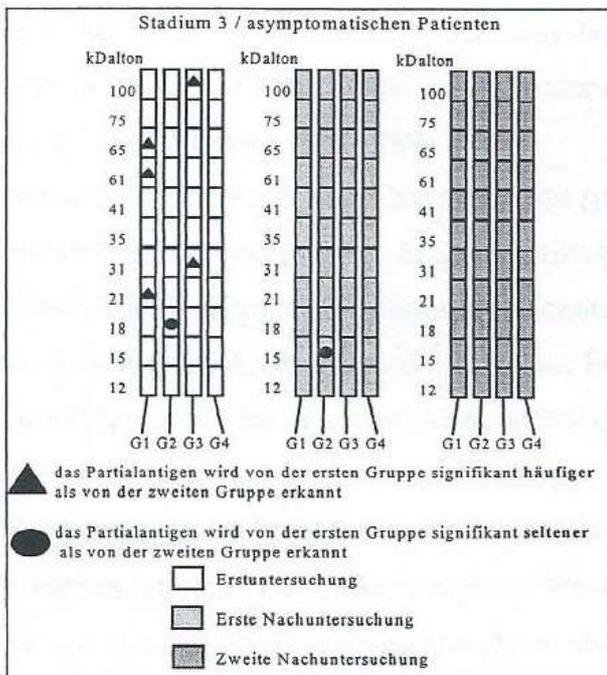


Abbildung 44: statistischer Vergleich der IgG-Subklassenblot-Ergebnisse zwischen Patienten im Stadium 3 und asymptomatischen Probanden

Verglich man welche Partialantigene von beiden Gruppen erkannt wurde, so wurde zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung von symptomatischen Patienten signifikant häufiger das 65-, 61- und 21-kDalton-Partialantigen mit Antikörpern der IgG1-Subklassen und das 100- und 21-kDalton-Partialantigen mit IgG3-Antikörpern erkannt. Asymptomatische Probanden erkannten signifikant häufiger das 18-kDalton-Partialantigen mit Antikörpern der IgG2-Subklasse. Diese Unterschiede ließen sich bei der Nachuntersuchung nicht mehr nachweisen.

6. Diskussion

Die Infektion mit dem Erreger *Borrelia burgdorferi* wird durch Zecken übertragen und führt zu einer multisystemischen Entzündung, die in einigen Fällen chronisch verläuft.

Es existieren nur wenige Krankheitsbilder, die für die Lyme-Borreliose spezifisch sind, wie das ECM, die Lyme-Arthritis oder das Garin-Bujadoux-Bannwarth-Syndrom. Daneben kann die Infektion mit *Borrelia burgdorferi* zu uncharakteristischen Krankheitsbildern führen, zum Beispiel zu einer Arthritis kleinerer Gelenke (Watanakunakom et al. 1992), einer Fibromyalgie (Dinermann et al. 1992) oder einer Karditis (van der Linde 1991). Dadurch ist die Diagnose einer Lyme-Borreliose allein aus dem klinischen Bild erschwert.

Untersucht man zur Sicherung der Diagnose das Patientenserum mit Hilfe des IFT, IFT-Abs, ELISA oder Westernblots, so erhält man Hinweise dafür, ob der Patient Kontakt mit *Borrelia burgdorferi* hatte oder nicht. Nach den Untersuchungen von Wilske et al. (1987) existiert jedoch eine hohe Durchseuchungsrate, wodurch die Aussagefähigkeit dieser Laborergebnisse eingeschränkt ist. Je nach Studie sind bei 4,4 bis 9,8% (Atamer 1995, Paul et al. 1987) der untersuchten Probanden Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* nachweisbar, auch ohne aktuelle oder frühere Krankheits Symptome, die sich mit einer Borreliose in Verbindung bringen lassen. In einer Studie von Fahrer et al. (1991) ist nachgewiesen worden, daß eine Serokonversion auch ohne Krankheitszeichen, also asymptomatisch, verlaufen kann. Daher muß bei positiven serologischen Befunden geklärt werden, ob sie im Zusammenhang mit einer aktuellen symptomatischen Lyme-Borreliose stehen, Zeichen einer asymptomatischen Serokonversion sind, oder serologische Narben einer ausgeheilten Lyme-Borreliose (Winward et al. 1989).

Bei diesem Problem hilft der Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* nur wenig weiter, da IgM-Antikörper nach einer Untersuchung von Ferder et al. (1992) und Engelsing (1993) bis zu 26 Monate persistieren können, obwohl der Proband symptomfrei ist. Andererseits sind in diesen beiden letzten Studien borrelienspezifische IgM-Antikörper nicht immer nachweisbar, auch wenn die Krankheit klinisch weiterhin aktiv ist.

Zur Lösung dieses Problems ist in dieser Untersuchung die Bestimmung der borrelienspezifischen IgG-Subklassen-Antikörper im Westernblot herangezogen worden.

Es soll in dieser Studie untersucht werden, ob bei symptomatischen Patienten und Personen mit asymptomatischer Borrelien-Infektion einzelne IgG-Subklassen die Immunantwort dominieren, ob es Unterschiede in den IgG-Subklassendominanzen bei beiden Gruppen gibt

und ob diese Unterschiede auf der Erkennung unterschiedlicher Antigene bei beiden Gruppen beruhen.

Daneben werden symptomatische Patienten mehrfach im Krankheitsverlauf untersucht, um festzustellen, ob zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche IgG-Subklassen dominieren.

Wird im Westernblot ein Partialantigen von Antikörpern des Patienten erkannt, so binden sich bei der Weiterverarbeitung des Blots enzymmarkierte Antikörper (Detektionsantikörper) an die Patientenantikörper. Durch die Reaktion der Enzyme entsteht eine Bande über diesem Partialantigen. Je mehr Patientenantikörper gegen dieses Partialantigen gerichtet sind, desto mehr Detektionsantikörper können sich binden.

Zunächst wird im Westernblot untersucht in welcher IgG-Subklasse die meisten Banden sichtbar werden und in welcher Subklasse diese Bandenfärbung am intensivsten ist. Die IgG-Subklasse mit den meisten und stärksten Banden wird dominierend genannt.

Bei der Auswertung der IgG-Subklassen-Westernblots zeigen sich folgende Ergebnisse:

1. Probanden mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion weisen bei der Erstuntersuchung signifikant häufiger eine IgG3-Dominanz auf als Patienten mit einer symptomatischen Borreliose im Stadium 1 und 3 (vergleiche Tabelle 22 und Tabelle 24).
2. Patienten mit einer symptomatischen Borreliose im Stadium 3 weisen bei der Erstuntersuchung signifikant häufiger eine IgG1-Dominanz auf als Patienten mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion (vergleiche Tabelle 24).
3. Asymptomatische Probanden erkennen alle Partialantigene von *Borrelia burgdorferi*. Die Antikörperspektren der symptomatischen Patienten und der asymptomatischen Probanden unterscheiden sich zwar, indem einzelne Partialantigene von asymptomatischen Probanden häufiger erkannt werden, doch finden sich diese Unterschiede bei anderen Subklassen als bei IgG3-Antikörpern. Demgegenüber sind bei der Erstuntersuchung von Patienten im Stadium 3 signifikant häufiger das 65-, 61- und 21-kDalton-Partialantigen mit Antikörpern der IgG1-Subklassen und das 100- und 21-kDalton-Partialantigen mit IgG3-Antikörpern erkannt worden als von asymptomatischen Probanden (vergleiche Seite 73, 75 und 77).

Damit ist die unterschiedliche IgG-Subklassendominanz nicht auf die Erkennung unterschiedlicher Antigene zurückzuführen.

4. Vergleicht man symptomatische Patienten und asymptomatische Probanden bezüglich der Konzentrationen der IgG-Gesamtmenge und der Subklassen, so sind bei Personen mit asymptomatischen Borrelien-Infektionen die Konzentrationen an IgG1- und IgG2-

Antikörpern signifikant größer als bei symptomatischen Probanden. Demgegenüber sind die Konzentrationen von IgG3 bei symptomatischen Patienten und asymptomatischen Probanden nicht signifikant unterschiedlich (vergleiche Abbildung 35).

Diese Befunde sprechen dafür, daß die Unterschiede in der IgG-Subklassenverteilung im Borrelien-Immuno blot sich nicht auf Unterschiede in den Konzentrationen der IgG-Subklassen zurückführen lassen.

5. Im zeitlichen Verlauf nimmt bei den symptomatischen Patienten die Häufigkeit einer IgG1-Dominanz ab und die Häufigkeit einer IgG3-Dominanz zu (vergleiche Tabelle 12, 15 und 18 und Abbildung 27, 28 und 29) und es bestehen zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung keine Unterschiede mehr hinsichtlich der IgG-Subklassen-Dominanzen zwischen den Patienten mit einer symptomatischen Borreliose und asymptomatischen Probanden (vergleiche Tabelle 22, 23 und 24).
6. Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 weisen schon bei der Erstuntersuchung vergleichbar oft eine IgG3-Dominanz und vergleichbar selten eine IgG1-Dominanz auf wie asymptomatische Probanden (vergleiche Tabelle 23).

Die Beobachtung unter Punkt 6 findet sich auch in den Ergebnissen einer Studie von Olsson et al. (1987). Diese Arbeitsgruppe hat jeweils 5 Patienten aus den drei Stadien der Lyme-Borreliose untersucht, davon 5 Patienten mit ECM (Stadium 1), 4 Patienten mit Meningitis und Facialisparesie und 1 Patient mit Arthritis (Stadium 2), sowie 5 Patienten mit ACA (Stadium 3). Hinweise auf die Krankheitsaktivität werden in diesem Artikel nicht wiedergegeben. Die Patientenserum sind mit Hilfe eines ELISA untersucht worden, der borrelienspezifische Antikörper der IgG-Subklassen mit Hilfe monoklonaler Antikörper nachweist. Damit kann die spezifische IgG-Subklassenantwort semiquantitativ untersucht werden. Es findet sich daß, die meisten Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* aus der IgG1-Subklasse stammen. Daneben läßt sich aber auch eine deutliche Antwort der IgG3-Subklasse nachweisen. Im Vergleich der einzelnen Krankheitsstadien findet sich bei der Patientengruppe im Stadium 2 eine höhere IgG3-Subklassenantwort, als bei Patienten im Stadium 1 und 3.

Eine Arbeitsgruppe um Hechemy et al. (1988) analysiert ebenfalls die IgG-Subklassenantwort gegen *Borrelia burgdorferi*. Sie haben im Querschnitt das Serum von insgesamt 78 Patienten aus allen drei Stadien der Lyme Borreliose untersucht, davon 9 mit ECM, 13 mit neurologischen oder cardiologischen Krankheitsbildern und 56 mit Arthritis. Die Seren sind sowohl mit einem Borrelien-Western blot als auch mit einem *Borrelia burgdorferi*-ELISA und *Treponema phagedenis*-ELISA hinsichtlich der IgG-Subklassen-Antikörper untersucht worden. Die Konzentrationen der spezifischen IgG-Subklassen-Antikörper ist mit Hilfe des

Absorbtionswertes im Borrelien-ELISA semiquantitativ bestimmt worden. Es finden sich überwiegend IgG1- und IgG3-Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi*. Im Stadium 3 wird der höchste Absorbtionswert bei IgG1 gefolgt von IgG3 gemessen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen dieser Studie.

Im Stadium 1 und 2 ist der Absorbtionswert im Borrelien-ELISA bei IgG3 am höchsten gefolgt von IgG1. Damit liegt bei Hechemy et al. (1988) eine andere Antikörperverteilung bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1 vor als in dieser Studie und bei der Arbeitsgruppe um Olsson et al. (1987). Die Unterschiede könnten darauf beruhen, daß in der Studie von Hechemy et al. (1988) bei den Patienten im Stadium 1 erst nach längerer Krankheitsdauer Blut entnommen worden ist, als in der Untersuchung von Olsson et al. (1987) oder der hier vorliegenden, da sich die IgG-Subklassenantwort im zeitlichen Verlauf von einer IgG1-Dominanz zu einer IgG3-Dominanz ändert, wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen.

Sowohl Olsson et al. (1987) als auch Hechemy et al. (1988) finden ein Überwiegen der IgG3-Antikörper bei Patienten im Stadium 2. Die oben genannte Beobachtung deckt sich mit den vorliegenden Ergebnissen (vergleiche Tabelle 23).

Leider ist in den Veröffentlichungen beider Studien nicht benannt, wie lange die Patienten erkrankt waren, bevor das Serum entnommen wurde, oder ob die Krankheit zum Zeitpunkt der serologischen Untersuchung klinisch aktiv gewesen ist. Zudem ist in jeder Studie nur Serum aber kein Liquor oder Synovialflüssigkeit untersucht worden.

Während bei Olsson et al. (1987), ebenso wie in der vorliegenden Studie, die Patienten im Stadium 2 überwiegend eine Neuroborreliose aufweisen, zeigt der überwiegende Teil der Patienten bei Hechemy et al. (1988) Affektionen der Gelenke. Damit ist in allen untersuchten Fällen das Entzündungsgeschehen auf ein Kompartiment beschränkt, sei es auf den Intrathekalraum, oder auf den Intrasynovialraum eines oder mehrerer Gelenke. Da sich die Entzündung bei diesen Patienten in einem begrenzten Kompartiment und nicht im Serum abspielt, ist zu diskutieren, ob im Serum eine andere IgG-Subklassendominanz vorliegt, als im betroffenen Kompartiment.

Hinweise dafür, daß in einem Kompartiment die immunologische Situation anders ist als im Serum, geben die Ergebnisse von Forsberg et al. (1995). Bei dieser Studie zeigen bei Patienten mit Neuroborreliose T-Zellen aus dem Liquor eine stärkere Reaktion auf Antigene von *Borrelia burgdorferi* als T-Zellen aus dem Serum derselben Patienten.

In der vorliegenden Studie zeigt sich in der Verlaufsuntersuchung, daß anfangs bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 1 und 3 eine IgG1-Dominanz vorliegt, während später eine IgG3-Dominanz nachweisbar ist.

Daß dieser Wechsel in der IgG-Subklassendominanz nicht ausschließlich eine Folge der Krankheitsdauer, also einen reinen Zeiteffekt darstellt, belegen die Befunde der Patientengruppe mit einer Borreliose im Stadium 3. Bei diesem Personenkreis liegt der Symptombeginn bei der Erstuntersuchung im Mittel 51,7 Monaten und damit signifikant länger zurück als bei den symptomatischen Patienten der Stadien 1 und 2. Trotzdem ist bei 7 von 9 untersuchten Patienten eine IgG1-Dominanz nachzuweisen. Damit produzieren Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 über eine längere Zeit hinweg IgG1-Antikörper als Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2.

Demgegenüber wird auch bei Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 nach antibiotischer Therapie die IgG1-Dominanz seltener und eine IgG1+3-Kodominanz häufiger. Daher scheint die Dauer der Erkrankung einen geringeren Einfluß auf die IgG-Subklassen-Antwort zu haben als eine antibiotische Therapie.

Geht man einen Schritt weiter und untersucht, welche Antigene von den einzelnen symptomatischen Patientengruppen erkannt wird, so zeigt sich, daß nur bei der Erstuntersuchung und der ersten Nachuntersuchung bei einzelnen Antigenen im Vergleich der Krankheitsstadien miteinander signifikante Unterschiede bestehen. Bei der zweiten Nachuntersuchungen lassen sich keine Unterschiede mehr nachweisen. Die Ergebnisse sind im einzelnen in der Abbildung 32 (S.62) dargestellt.

Es zeigt sich, daß Patienten im Stadium 3 bei der Erstuntersuchung 4 Antigene häufiger mit IgG1-Antikörpern erkennen, als der Rest der symptomatischen Patienten. Daneben erkennen sie das 65-kDalton-Partialantigen signifikant häufiger mit IgG3-Antikörpern, als die übrigen symptomatischen Patienten. Patienten im Stadium 2 erkennen bei der Erstuntersuchung mit IgG1-Antikörpern 4 Antigene signifikant seltener als der Rest der symptomatischen Patienten. Bei der ersten Nachuntersuchung erkennen Patienten im Stadium 2 nur ein Antigen signifikant häufiger und Patienten im Stadium 3 erkennen drei Antigene signifikant häufiger als der Rest der symptomatischen Patienten.

Im Vergleich mit asymptomatischen Probanden finden sich bei der Erstuntersuchung auch einzelne signifikante Unterschiede. Diese sind in Abbildung 40 (S.73), Abbildung 42 (S. 75) und Abbildung 44 (S.77) dargestellt.

So erkennen asymptomatische Patienten bei der Erstuntersuchung im Vergleich mit Patienten im Stadium 1 signifikant häufiger das 35-kDalton-Partialantigen mit IgG1-Antikörpern, im Vergleich mit Patienten im Stadium 2 signifikant häufiger das 35- (mit IgG1 und 2), das 18- (mit IgG2) und das 41-kDalton-Partialantigen (mit IgG4).

Demgegenüber erkannten bei der Erstuntersuchung Patienten im Stadium 3 signifikant häufiger das 65-, 61- und 21-kDalton-Partialantigen mit Antikörpern der IgG1-Subklassen und das 100- und 21-kDalton-Partialantigen mit IgG3-Antikörpern als asymptomatische Probanden.

Bei der ersten Nachuntersuchung finden sich weniger Unterschiede zwischen symptomatischen Patienten und asymptomatischen Probanden, bei der zweiten keine signifikanten Unterschiede mehr.

Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten wurden die Patienten, die in diese Studie einbezogen wurden, sorgfältig ausgewählt. Sie sind aufgrund positiver Antikörpernachweise gegen *Borrelia burgdorferi* im ELISA, IFT, IFT-Abs und IgM-/ IgG-Westernblot einbezogen worden. Die Kriterien für positive Befunde sind bei der jeweiligen Methodenbeschreibung unter Punkt 3 aufgeführt.

In einem Fall ist bei einer Patientin mit ECM die eindeutige klinische Symptomatik ausreichend gewesen, obwohl die Antikörpertiter im ELISA hier im grenzwertigen Bereich lagen.

Alle Probanden sind klinisch untersucht worden. Dabei ist bei symptomatischen Patienten die Diagnose gesichert worden, außerdem ist festgestellt worden, ob die Krankheit aktiv ist. Bei asymptomatischen Probanden sind andere Ursachen für die Syndrome ermittelt und ein durch Borrelien ausgelöstes Krankheitsbild ausgeschlossen worden.

Bei 3 asymptomatischen Probanden liegen entzündliche Systemerkrankungen vor, bei einer Patientin ein malignes Geschehen (vergleiche Tabelle 20). Die Grunderkrankungen dieser vier asymptomatischen Probanden kann sich auf die immunologische Reaktion dieser Personen auswirken. Es wäre bei den ersten drei Probanden mit einer unspezifischen Aktivierung der Antikörperproduktion zu rechnen, während bei dem vierten durch die zytostatische Therapie eine Immunsuppression mit geringerer Antikörperproduktion zu erwarten wäre. Ein solcher Effekt wäre angesichts der geringen Anzahl der betroffenen Probanden vernachlässigbar gering.

Bei den in dieser Studie verglichenen Patientengruppen sind sich hinsichtlich der Geschlechtsverteilung und des Alters keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Dies ist für die Vergleichbarkeit beider Gruppen nötig, da die IgG-Subklassen-Produktion nach einer

Studie von Grundbacher et al. (1970) vom Alter und dem Geschlecht der Probanden abhängig ist.

Für die Beurteilung der vorliegenden Studienergebnisse ist neben der Art, wie die Patienten und die Kontrollen ausgewählt werden, neben der Geschlechts- und Altersverteilung beider Gruppen auch der methodische Ansatz wichtig. Im folgenden sollen die hier verwendeten Methoden einer kritischen Betrachtung unterzogen werden.

Der in allen serologischen Tests (ELISA, IFT, Westernblot) eingesetzte *Borrelia burgdorferi* Stamm B₃₁ ist das erste Isolat von Shelter Island (Barbour et al. 1983, Johnson et al. 1984), der zur Untergruppe *Borrelia burgdorferi sensu strictu* gehört (Lebech et al. 1994). Es handelt sich um einen amerikanischen Stamm, dessen Einsatz in der Serodiagnostik durch verschiedene Faktoren begründet ist. Nach dem gelelektrophoretischen Auftrennen weisen die Partialantigene eine hervorragende Antigenität auf. Der Stamm besitzt Partialantigene in einem großen Molekulargewichtsbereich (100-kDalton bis < 10-kDalton). Dies führt dazu, daß durch B₃₁ ein sehr großes Antikörper-Spektrum in den untersuchten Seren erfaßt und detektiert werden kann (eigene Erfahrung).

Der IFT ist aufgrund der Präsentation ganzer Borrelien besonders anfällig für Kreuzreaktionen, da einige Oberflächenantigene bei verschiedenen anderen Erregern vorkommen (Bruckbauer et al. 1992). Dieser Mangel wurde im Absorbtions-IFT durch die Absorption des Patientenserums mit *Treponema phagedenis*-Antigen verringert. Beide Methoden eignen sich zur Screening-Untersuchung von größeren Patientengruppen, jedoch können nur Antikörper detektiert werden, die gegen Oberflächenantigene gerichtet sind und andererseits ist die Differenzierung der Antikörper nach dem erkannten Antigen mit dieser Methode nicht möglich. Dieses schmalere Antigenpektrum erklärt die, zum Teil großen, Konzentrationsunterschiede bei der Untersuchung eines Patientenserums im IFT und im ELISA, da im ELISA alle Partialantigene zur Bindung mit Patientenantikörpern angeboten werden. Da die Auswertung des IFT und des IFT-Abs durch optische Kontrolle des Untersuchers erfolgt, ist sie in bestimmten Grenzen subjektiv und benötigt Erfahrung.

Für den ELISA als Untersuchungsmethode spricht, daß er sich photometrisch ablesen läßt und so die subjektive Beurteilung der Ergebnisse minimiert ist. Der ELISA ist je nach Antigenpräparation deutlich spezifischer als der IFT. Beim ELISA ist ebenfalls keine Differenzierung der Patientenantikörper anhand der erkannten Epitope möglich.

Der Western-Blot ist gewählt worden, um bestimmen zu können, gegen welche Partialantigene die Antikörper gerichtet sind und um zu klären, ob das Antikörperspektrum bei symptomatischen Patienten und bei Probanden mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion unterschiedlich ist.

Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von *Borrelia burgdorferi* werden die Disulfidbrücken durch die reduzierende Wirkung von DTE (Dithioerythrit) gelöst. Die aliphatischen Ketten des SDS binden sich an hydrophobe Gebiete, wodurch sich die Proteinketten entfalten. So können sich im Lauf des Trennverfahrens unter Einwirkung des SDS die Strukturen der antigenen Determinanten (Epitope) stark verändern. Theoretisch wäre möglich, daß eine Bindung mit dem jeweils entsprechenden Antikörper kaum noch oder gar nicht mehr stattfindet (Bossche 1990). Eine solch starke Veränderung der Proteine scheint sich aber in den Gelelektrophoresen von *Borrelia burgdorferi* Antigenen nicht auszuwirken, da anschließend spezifische Antigen-Antikörper-Reaktionen im Immunoblot detektiert werden können. Renaturierungsvorgänge durch die Abtrennung der denaturierenden Substanzen (SDS) beim Austritt aus dem Gel oder während des Blotvorganges könnten den Proteinen ihre ursprüngliche Struktur wiedergeben. Deshalb muß davon ausgegangen werden, daß die Antigene von *Borrelia burgdorferi* in weitgehend nativem Zustand für den Nachweis von Antikörpern zur Verfügung stehen (Bossche 1990). Hierfür spricht auch, daß borrelienspezifische Antikörper im Immunoblot nicht mehr binden, wenn sie zuvor durch morphologisch intakte fixierte Borrelien gebunden wurden (Alfen et Wellensiek 1992).

Um die Beurteilung eines Westernblots sicher durchführen zu können, müssen die untersuchten Banden eindeutig identifiziert werden.

In einer Untersuchung von Engelsing (1995) ist durch parallele Auftrennung der Partialantigene des im Labor verwendeten Borrelienantigens mit standardisierten Proteinmarkern der direkte Vergleich der Laufweite der Proteinmarker mit den Laufweiten der Partialantigene durchgeführt worden, dadurch sind die Massen der einzelnen Partialantigene bestimmt worden. Zudem sind diese Blot-Streifen mit den aufgetrennten Partialantigenen mit dem Serum eines hochtitrig seropositiven Patienten inkubiert und anschließend entwickelt worden. Vergleicht man nun die Banden, die durch die Antikörper des Patienten und der Detektionsantikörper entstehen, mit den Laufweiten der standardisierten Proteinmarkern, so lassen sich die Molekulargewichte der erkannten Partialantigene dieses Patienten eindeutig bestimmen. In der Folge wird dieses Serum als Positivkontrolle und Inter-Assay-Kontrolle eingesetzt, das heißt es dient zur Kontrolle der Blot-Herstellung und als

Marker Serum zur Identifikation der einzelnen Partialantigene beim Vergleich mit neuen Patienten.

Neben der Identifikation der Partialantigene, müssen Kreuzreaktionen zwischen unspezifischen Antikörpern des Patientenserums und dem Antigen weitgehend ausgeschlossen werden, um die Beurteilung eines Westernblots sicher durchführen zu können.

Bei einem Teil der untersuchten Antigene (75-, 65-, 61-, 35-, 18-, 15-, 12-kDalton) werden in einer Untersuchung von Bruckbauer et al. (1992) mehr oder weniger starke Kreuzreaktionen mit den Antigenen anderer Spirochäten, Leptospiren, Salmonellen, Yersinien, Pseudomonaden, Neisserien, Camphylobacter, Pasteurellen, Listerien, Legionellaceae beschrieben. Weitere Studien zeigen, daß folgende Antigene eine niedrige Spezifität besitzen, so das 66-, das 60- und das 41-kDalton-Partialantigen (Atamer 1995, Fawcett et al. 1992, Marconi et al. 1993). Besonders stark ist die Kreuzantigenität zwischen *Borrelia burgdorferi* und apathogenen Treponemen, zum Beispiel *Treponema phagedenis* (Alfen et Wellensiek 1992). Das Antigen von *Treponema phagedenis* wird in dieser Untersuchung als Absorbens für unspezifischen Antikörper verwendet, so daß Kreuzreaktivitäten sehr reduziert werden.

Solche gering spezifischen Antigene finden sich im Bandenmuster asymptomatischer Probanden häufig, jedoch nicht signifikant häufiger als bei den symptomatischen Patienten. Daneben werden aber auch das 100- und 31-kDalton-Antigen von asymptomatischen Probanden und symptomatischen Patienten gleich häufig erkannt. Diese Antigene gelten im Westernblot als sehr spezifisch für *Borrelia burgdorferi* (Bruckbauer et al. 1992). Dies belegt, daß es sich bei den Antikörpern der asymptomatischen Probanden nicht ausschließlich um Kreuzreaktionen handelt, vielmehr ist bei ihnen aufgrund des Bandenmusters ein früherer Erregerkontakt wahrscheinlich. Dieser Kontakt kann entsprechend der Untersuchung von Fahrer et al. (1992) asymptomatisch abgelaufen sein und nach den Ergebnissen von Ferder et al. (1992) aufgrund der Antikörperpersistenz länger zurückliegen.

Besonders bei schwach angefärbten Banden ist Erfahrung nötig, um die Beurteilung des Westernblots sicher durchzuführen.

Die Qualität der Auswertung der Westernblots ist dadurch optimiert worden, daß alle Blots von zwei Personen unabhängig voneinander ausgewertet wurden. Sind einzelne Banden unterschiedlich bewertet worden, was bei sehr schwach angefärbten Partialantigenen

gelegentlich der Fall war, so ist erneut eine Kontrolle der Auswertung erfolgt. Damit sollte sowohl das Risiko einer Überbewertung, als auch einer Unterbewertung der erkannten Partialantigene minimiert werden.

Um die Bandenmuster verschiedener Patienten miteinander vergleichen zu können, muß eine Inter-Assay-Kontrolle bei jeder Durchführung des Westernblots mitlaufen. Als Inter-Assay-Kontrolle ist, wie oben beschrieben, das Serum eines Patienten verwendet worden, welches Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* in hohen Konzentrationen enthält. Dieses Serum ist als Positivkontrolle bei allen Westernblots mit untersucht worden.

Die Bestimmung der IgG-Subklassen als Kriterium der Krankheitsaktivität erscheint erfolgversprechend, da sich in der Literatur in verschiedenen Studien zeigt, daß im Verlauf einer Immunreaktion zunächst IgG1-Antikörper gegen das Antigen gebildet werden, während IgG3-Antikörper später produziert werden.

Frey und Rao (1995) finden im Mausmodell kurz nach der Exposition mit *Borrelia burgdorferi* eine IgM- und IgG1-Antikörperproduktion.

Auch wird bei Hyposensibilisierungen mit verschiedenen Allergenen von Sondergaard et al. (1991) am Anfang der Behandlung ein Anstieg der spezifischen IgG1-Antikörperkonzentration und erst später eine Zunahme der IgG4-Antikörperkonzentration beobachtet. In einer Studie von Torgano et al. (1992) stellt sich heraus, daß IgG1 produzierende B-Zellen bei Patienten mit chronischer viraler Hepatitis häufiger zu finden sind als bei gesunden Probanden. Diese Beobachtung interpretiert der Autor dahingehend, daß eine Erhöhung der IgG1-Konzentration durch eine Aktivierung der Immunglobulinproduktion durch Antigene verursacht sein könnte.

Mathiesen et al. (1988) beobachtet bei Patienten mit Herpes simplex Encephalitis als typische IgG-Subklassenantwort einen frühen Anstieg spezifischer IgG1-Antikörper. In den ersten Proben, die früh im Krankheitsverlauf gewonnen werden, sind keine IgG3-Antikörper nachzuweisen, jedoch in den Proben, die 10 bis 20 Tage nach dem Krankheitsbeginn gewonnen werden.

Salimonou et al. (1982) findet bei Patienten mit akuter Malaria erhöhte Konzentrationen an spezifischen IgG1-Antikörpern, während alle anderen Subklassen gegenüber der Konzentration im symptomfreien Intervall deutlich abnehmen.

Daneben wird von Baugh et al. (1988) beobachtet, daß bei Patienten mit primärer Syphilis vor allem IgM- und IgG1-Antikörper entstehen, während bei einer aktiven sekundären Syphilis IgG1- (53% des Gesamt-IgG) und IgG3-Antikörper (43% des Gesamt-IgG) vorliegen.

Coleman et al. (1985) können im Serum von Patienten mit aktiver Herpes simplex Virus Infektion (n=145) innerhalb von 21 Tage nach der Infektion keine IgG3-Antikörper gegen

Herpes simplex nachweisen, während spezifische IgG1-Antikörper in allen untersuchten Seren gefunden werden.

Junker et al. (1987) untersucht die Immunantwort gegen Vollvirusantigen von Varizella-Zoster-Virus. Bei dieser Studie fällt ebenfalls auf, daß IgG1-Antikörper als erste gebildet werden, während IgG3-Antikörper erst im Verlauf der Erkrankung nachweisbar sind.

Desweiteren beobachtet Sundquist et al. (1984) bei Patienten mit Varizella eine IgG1-Dominanz und bei Patienten mit Zoster eine IgG3-Dominanz.

Eine IgG3-Dominanz wird meist erst im späteren Krankheitsverlauf beobachtet.

So haben Morell-A et al. (1983) die Seren von Patienten untersucht, die 2 Jahre oder länger zuvor eine Hepatitis B hatten. Dabei beobachten sie, daß die IgG-Antikörper gegen die Hepatitis B Oberfläche auf die Subklassen IgG1 und IgG3 beschränkt sind und daß mehr IgG3-Antikörper als IgG1-Antikörper nachweisbar sind. Bei diesen Patienten ist die Hepatitis abgeklungen, sodaß auch hier bei fehlender Krankheitsaktivität eine IgG3-Dominanz gegen dieses Antigen vorliegt.

Insgesamt zeigen diese Studien, daß die Produktion von IgG1-Antikörpern im Krankheitsverlauf meist früh erfolgt und einen Hinweis für eine aktive Krankheit darstellen kann. Dies deckt sich mit unserer Beobachtung, daß diese Subklasse die Immunantwort bei Patienten mit einer aktiven symptomatischen Borreliose im Stadium 1 dominiert (vergleiche Tabelle 12). Bei diesen Patienten besteht die Krankheit durchschnittlich seit 1,8 Monaten (vergleiche Tabelle 10) und die Patienten weisen entzündliche Infiltrate der Haut auf. Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 weisen ebenfalls am häufigsten eine IgG1-Dominanz auf (vergleiche Tabelle 18), obwohl bei diesen die Krankheit im Durchschnitt seit 41,6 Monaten besteht (vergleiche Tabelle 16). Daher ist anzunehmen, daß die IgG-Subklassenproduktion nicht allein von der Zeitdauer der Krankheit abhängt. Demgegenüber ist beobachtet worden, daß Probanden mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion, nur selten eine IgG1-Dominanz aufweisen (vergleiche Tabelle 21). Dies macht wahrscheinlich, daß bei dieser Personengruppe die frühe Phase der Immunantwort beendet ist.

Die meisten bisherigen Studien untersuchen die IgG-Subklassenverteilung in der Immunantwort an einem Patientenquerschnitt. Besonders die IgG-Subklassen-Antwort gegen einzelne Antigene wird in der Literatur dargestellt. Die Artikel, die eine IgG1-Dominanz beschreiben sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Autor	Erreger	Methode	Antigen	dominante Subklasse
Hammarström-L et al. (1985)	Hämophilus influenza	ELISA	Äußere Membran Proteine	IgG1
Hammarström-L et al. (1985)	Staphylococcus aureus	ELISA	Alpha-Toxin	IgG1
Christensson-B et al. (1985)	Staphylococcus aureus	RIA	toxic-shock-syndrom protein	IgG1
Hammarström-L et al. (1983)	Clostridium difficile	ELISA	Toxin A und B	IgG1
Mathiesen-T et al. (1990)	Masern-Virus	ELISA	Vollvirus-Antigen	IgG1
Mergener-K et al. (1987)	HIV	ELISA + Westernblot	Vollvirus-Antigen	IgG1
Seppelä-IJT et al. (1984)	Neisseria meningitidis	ELISA	Polysaccharid Typ A	IgG1
Persson-MAA et al. (1986)	Salmonella paratyphosa	ELISA	Lipopolysaccharide (O-Antigen)	IgG1
Persson-MAA et al. (1986)	Salmonella typhosa	ELISA	Lipopolysaccharide (O-Antigen)	IgG1

Tabelle 25: Dominanz des Immunglobulin G1 bei verschiedenen bakteriellen und viralen Infektionskrankheiten.

Es handelt sich bei den Antigenen überwiegend um Proteine, jedoch lassen sich, wie die drei letzten Studien belegen, auch IgG1-Antikörper gegen Polysaccharide und Lipopolysaccharide nachweisen.

Grauballe et al. (1986) untersucht bei Infektionen mit Rotavirus die IgG-Subklassen-Antwort im Verlauf der Erkrankung. Er weist im Gegensatz zu den vorgenannten Artikeln erst IgG3-Antikörper nach. IgG1-Antikörper sind erst nach 2 Monaten nachzuweisen. Der Unterschied könnte auf den unterschiedlichen Antigenen des Virus im Gegensatz zur Kapsel grampositiver Bakterien und der äußeren Membran gramnegativer Bakterien beruhen. Die Patienten sind nicht hinsichtlich ihrer IgG-Subklassen-Konzentration untersucht worden, daher wäre auch ein IgG1-Defizit bei den untersuchten Patienten möglich.

In den übrigen Studien, die die IgG-Subklassenantwort auf virale Antigene zum Thema hatten, wurden keine Verläufe, sondern Querschnitte untersucht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt. Hier finden sich häufig Kodominanzen, also gleich große Konzentrationen, an spezifischem IgG1 und IgG3.

Autor	Erreger	Methode	Antigen	dominante Subklasse
Linde-A et al. (1983)	Cytomegalie Virus	ELISA	Vollvirus-Antigen	IgG1 + 3 IgG3
Hofmann-H (1985)	FSME	ELISA	Vollvirus-Antigen	IgG1 IgG3
Linde-GA et al. (1985)	Rubella Virus	ELISA	Vollvirus-Antigen	IgG1 IgG3
Rubin- RL et al. (1986)	Autoantigen	ELISA	Anti-Doppelstrang DNA Anti-glatte Muskelzellen Anti-Histone	IgG1 IgG1 + 3 IgG1 + 3

Tabelle 27: Kodominanz von IgG1 + 3 bei verschiedenen viralen und Auto-Antigenen

Die Subklasse-IgG1 stellt, mit 60,3 - 71,5 % aller Antikörper, den größten Teil der Antikörperproduktion (Hamilton 1987). Sie wird bei Antigenkontakt früh gebildet und dominiert auch bei der Immunantwort gegen Proteine (Hamilton 1987). Es finden sich aber, wie oben beschrieben, seltener auch IgG1-Antikörper gegen Polysaccharide und Lipopolysaccharide.

Antikörper dieser Subklasse zeichnen sich dadurch aus, daß sie Komplement auf dem klassischen Weg aktivieren können, daß sie cytophil auf Monozyten, Neutrozyten, Lymphozyten und Plättchen wirken. Damit spielen sie eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Entzündungsreaktionen. Zudem stammen die Antikörper bei allergischen Reaktionen überwiegend aus der IgG1-Subklasse.

Die Produktion von IgG1 wird unter anderem von TH₂-Zellen, Differenzierungsformen der T-Helfer-Zellen, kontrolliert, die überwiegend Interleukin-4 (IL-4) produzieren (Layton et al. 1984). Stimulation der aktivierten B-Zelle mit diesem Botenstoff führt zu einem Antikörper-switch von IgM zu IgG1 und, falls das Zytokin in hohen Konzentrationen vorliegt, zu IgE. So würden B-Zellen der Maus, die mit Lipopolysacchariden (LPS) aktiviert sind von sich aus IgG3-Antikörper produzieren. Zugabe von IL-4 bewirkt statt dessen die Produktion von IgG1-Antikörpern (Radbruch et al. 1986).

Im Gegensatz zur TH₂-Zelle produzieren TH₁-Zellen überwiegend IFN- γ . Dieses Zytokin fördert, wie in der Tabelle 26 dargestellt, je nach Aktivator die Bildung von IgG3 und hemmt die Bildung von IgG1.

Zytokin	produzierende Zelle	fördert Bildung von	Wachstum / Differenzierung	hemmt Bildung von
IL-4	T, M, eo, mast, NK	IgG1, IgE	+	IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM
IL-10	M	IgM, IgG, hIgG1, hIgG3	+	-
IL-13	T	IgM, IgG _{total} , hIgE, hIgG4	-	-
IFN- γ	T, NK, M	IgG2a, IgG3 (je nach Aktivator)	+	IgG1, IgG2b, IgG3 (je nach Aktivator), IgE (Antagonist von IL-4+ IL-5)

Tabelle 26: Zytokine die an der Regulation der IgG-Subklassenproduktion beteiligt sind, nach Laman et Claassen (1996) T: T-Zelle, M: Makrophage, NK: Natürliche Killerzellen, mast: Mastzelle, eo: eosiniphiler Granulozyt, h: humaner Antikörper,

Der Anteil der IgG3-Antikörper an der Gesamtmenge des IgG beträgt nach der Untersuchung von French et al. (1986) 5,0 bis 8,4%.

Der IgG3-Antikörper hat eine größere Masse als die anderen IgG-Subklassen (Hamilton 1987), da die „hinge region“, das Verbindungsstück zwischen Fc-Stück und den leichten Ketten, länger ist als bei den anderen drei IgG-Subklassen. Durch diesen Unterschied in der Struktur wird die stärkere Aktivierbarkeit des Komplementsystems durch IgG3-Antikörper erklärt (Feinstein et al. 1986). Die Halbwertszeit von IgG3-Antikörpern ist mit 7 Tagen nur ein Drittel so lang, wie bei den drei anderen Subklassen (Junker et Telley 1994). IgG3-Antikörper besitzen wie IgG1-Antikörper cytophile Wirkung auf Monocyten, Neutrophile, Plättchen und Lymphocyten. Die Spezifität der IgG3-Antikörper entspricht der von IgG1-Antikörpern und sie sind ebenfalls gegen Proteine gerichtet.

Das Zusammenspiel der T-Zellen, der Zytokine, der Borrelien und der Effekt auf die Regulation der IgG-Subklassen wird im folgenden dargestellt.

Drei Tage alte Mäuse verschiedener Stämme entwickeln eine schwere Arthritis bei Infektion mit Borrelien. Liegt das Alter der Tieren bei drei Wochen so entwickeln nur C3H-Mäusen (Haplotyp: H-2K) dieses Krankheitsbild. Die humorale Immunantwort ist bei diesen am ausgeprägtesten (Barthold et al. 1990). Stimulationsexperimente zeigen, daß Lymphocyten dieser Stämme bei Reexposition mit Borrelienantigen vorwiegend IFN- γ produzieren, das wie oben angegeben das charakteristische Zytokin der TH₁-Zellen ist. Im Gegensatz dazu korreliert geringe Krankheitsaktivität bei z. B. BALB-Mäusen (Haplotyp: H2-K) mit Vorherrschen der TH₂-Zellen mit geringer IFN- γ jedoch ausgeprägter IL-4-Produktion.

Subklassenanalysen zeigen, daß resistente Mäuse eine IgG1-dominierte Immunantwort haben, während Erkrankung bei Mäusen mit IgG2 korreliert. IgG3 ist in diesen Studien nicht untersucht. Die IgG1-Dominanz wird als zusätzlicher Hinweis einer TH₂-dominierten Immunantwort gewertet, da IL-4 die Umschaltung von IgM zu IgG1 und IgE unterstützt. Die unterschiedliche IgG-Subklasendominanz könnte demnach mit einer unterschiedlichen Differenzierung der T-Helfer-Zellen bei Patienten mit symptomatischer Borreliose und bei asymptomatischen Probanden zusammenhängen. Bei Reexposition immunisierter Mäuse mit *Borrelia burgdorferi* findet sich der ausgeprägteste Antikörperanstieg in der IgG1-Subklasse. Weitere Experimente demonstrieren jedoch, daß *Borrelia burgdorferi* die Synthese von spezifischen IgG1 auch bei Abwesenheit von IL-4 induziert (Frey et Rao 1995). Somit müssen hohe IgG1-Antikörper-Konzentrationen nicht mit einer TH₂-dominierten Immunantwort korrelieren.

Ein weiterer Faktor bei der Regulation der humoralen und zellulären Immunantwort ist *Borrelia burgdorferi* selbst, da es nach der Untersuchung von Schoenfeld et al. (1992), auch allein in der Lage ist B-Zellen zur Mitose und Differenzierung zu Plasmazellen anzuregen. Einzelne B-Zellen produzieren anschließend ohne weitere Aktivatoren Antikörper. Desweiteren induziert *Borrelia burgdorferi* in T-Zellen die Produktion von Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α), Interferon- γ (INF- γ), Granulozyten- und Makrophagen-Kolonie-Stimmulierender-Faktor (GM-CSF) (Yssel et al. 1990), und in Monozyten wird die Produktion von Interleukin 1- β (IL-1 β), Interleukin 1- α (IL-1 α) und körpereigenem Interleukin 1-Rezeptor-Antagonist (IL-1RA) gesteigert (Miller et al. 1992). Interleukin 1 wird eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und Persistenz der Lyme Arthritis zugesprochen (Miller et al. 1993). Die Regulation der IgG-Subklassenproduktion resultiert demnach aus dem Zusammenspiel aller beteiligter Faktoren.

Unklar ist, warum bei asymptomatischen Probanden vorwiegend spezifische IgG3-Antikörper zu finden sind. Neben IFN- γ kann IL-10 die Umschaltung von IgM auf IgG3 fördern. IL-10 wirkt immunsupprimierend u. a. durch Hemmung der Sekretion von IFN- γ . Demnach würde ein Fehlen von IL-10 die Entwicklung einer TH₁ immundominierenden Antwort fördern. IL-10 im Überschuß würde eine TH₂-Immunantwort begünstigen und die Entzündungsreaktion begrenzen. IL-10 wird u. a. von Makrophagen produziert. Borrelien können die Makrophagenfunktion modulieren. Diese experimentellen Befunde werden bestätigt durch den Nachweis einer Anreicherung IFN- γ produzierender TH₁-Zellen im Liquor und

Synovialflüssigkeit im Vergleich zum Blut bei Patienten mit Lyme-Arthritis (Yssel et al. 1991) und Neuroborreliose (Forsberg et al. 1995).

Zusammenfassend zeigt sich, daß IgG1-Antikörper zu Beginn der Immunantwort gegen *Borrelia burgdorferi* gebildet werden, während IgG3-Antikörper in der späteren Immunantwort überwiegen. Damit läßt sich mit der Untersuchung der spezifischen IgG-Subklassen abschätzen in welcher Phase des Krankheitsverlaufes sich ein Patient befindet.

Und der Nachweis borrelienspezifischer Antikörper der IgG1-Subklasse scheint ein Hinweis für das Vorliegen einer aktiven Krankheit zu sein.

Die Tatsache, daß Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 im Serum keine IgG1-Dominanz aufweisen, könnte damit zusammenhängen, daß sie zum einen an einer Neuroborreliose oder einer Lyme-Arthritis leiden. Bei diesen Patienten findet die Auseinandersetzung mit dem Erreger überwiegend in einem anderen Kompartiment als dem Serum statt, nämlich im Liquor oder in der Synovia und der Synovialflüssigkeit. Damit wäre eine Untersuchung des Serums, für diese beiden Patientengruppen, eine Untersuchung des falschen Kompartimentes und müßte durch Untersuchungen von Liquor beziehungsweise Synovialflüssigkeit ergänzt werden.

In der vorliegenden Studie wurde die Dominanz einer IgG-Subklasse nur anhand der Bandenanzahl und der Bandenintensität im Westernblot abgeschätzt. Eine genauere Quantifizierung der borrelienspezifischen IgG-Subklassen-Antikörper, zum Beispiel mittels eines IgG-Subklassen-ELISA mit Borrelien-Antigen könnte die Ergebnisse dieser Untersuchung präzisieren.

7. Zusammenfassung

1. Bei der Diagnose einer Borrelien-Infektion bestehen Schwierigkeiten, da bei uncharakteristischer Symptomatik und positivem serologischem Befund eine symptomatische Erkrankung nicht leicht von einer asymptomatischen Serokonversion unterschieden werden kann.
2. Verschiedene Studien zeigen, daß sich die spezifische IgG-Subklassen-Produktion im Verlauf einer Immunantwort verändern kann. Dabei werden häufig als erstes spezifische IgG1-Antikörper beobachtet, während andere Subklassen, so Antikörper der Subklasse IgG3 meist erst später nachgewiesen werden können.
3. Patienten mit einer symptomatischen Borreliose im Stadium 1 und 3 weisen initial häufiger eine IgG1-Dominanz auf als Patienten mit einer asymptomatischen Borrelien-Infektion. Letztere weisen signifikant häufiger eine IgG3-Dominanz auf als Patienten mit einer symptomatischen Borreliose im Stadium 1 und 3.
4. Diese Unterschiede der IgG-Subklassen-Dominanzen sind keine Folge unterschiedlicher Konzentrationen der IgG-Subklassen in den betrachteten Gruppen.
5. Die Unterschiede der IgG-Subklassen-Dominanzen lassen sich nicht durch Erkennung unterschiedlicher Antigene bei symptomatischen Patienten und asymptomatischen Probanden erklären.
6. Der Nachweis von IgG3-Antikörpern bei *Borrelia burgdorferi* Infektionen ist nicht direkte Folge einer längeren Krankheitsdauer, da Patienten mit einer Borreliose im Stadium 3 auch nach einer Krankheitsdauer von mindestens 6 Monaten überwiegend eine IgG1-Dominanz aufweisen.
7. Nach einer antibiotischen Therapie nimmt bei den symptomatischen Patienten im zeitlichen Verlauf die Häufigkeit einer IgG1-Dominanz ab und die Häufigkeit einer IgG3-Dominanz zu, sodaß bei den Nachuntersuchungen keine Unterschiede mehr hinsichtlich der IgG-Subklassen-Dominanzen zwischen den Patienten mit einer symptomatischen Borreliose und asymptomatischen Probanden bestehen.
8. Patienten mit einer Borreliose im Stadium 2 weisen schon bei der Erstuntersuchung vergleichbar oft eine IgG3-Dominanz und vergleichbar selten eine IgG1-Dominanz auf wie asymptomatische Probanden.
9. Da Patienten im Stadium 2 in dieser Studie überwiegend an einer Neuroborreliose leiden, ist zu diskutieren, ob die IgG-Subklassenverteilung der intrathekal gebildeten Antikörper der im Serum entspricht, oder ob im Liquor eine IgG1-Dominanz vorliegt. Dieser Punkt müßte in einer weiteren Untersuchung abgeklärt werden.

8. Literatur

1. Aceti A, Pennica A; Teggi A; Fondacaro LM; Caferro M; Leri O; Tacchi G; Celestino D; Quaranta G; De Rosa F; et al (1993): IgG subclasses in human hydatid disease: prominence of the IgG4 response. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;102(4):347-351
2. Afzelius-A (1909): Report zu Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm am 16. Dezember 1909. *Arch Derm Syph* 1909; 101:405-406
3. Alfen-I, Wellensiek-HJ (1992): Die Bedeutung kreuzreagierender Antikörper für die Serodiagnostik der Lyme-Borreliose und die Syphilis. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Leipzig; 28.-30. September 1992
4. Alfen-I (1992): Erregerspezifische und kreuzreagierende Antigene von *Borrelia burgdorferi* und ihre Bedeutung für die serologische Diagnostik. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Justus-Liebig Universität Gießen, S.: 34, 36-37, 73-74
5. Atamer-C (1994), Die humorale Immunantwort bei asymptomatischen *Borrelia burgdorferi* Infektionen: Eine epidemiologische und immunologische Studie an Blutspendern; Dissertation an der Justus-Liebig Universität Gießen: 42
6. Aucouturier-P, Mournir-S, Preud'homme-JL (1985): Distribution of IgG subclass levels in normal adult sera as determined by a competitive enzyme immunoassay using monoclonal antibodies. *Diagn Immunol.* 3: 191-196
7. Baig-S; Olsson-T; Hansen-K; Link-H (1991): Anti-*Borrelia burgdorferi* antibody response over the course of Lyme neuroborreliosis. *Infect Immun.* 1991 Mar; 59(3): 1050-1056
8. Bannwarth-A (1944): Zur Klinik und Pathogenese der „chronischen lymphocytären Meningitis“. *Arch Psychiatr Nervenkr*, 117: 161-185
9. Baraton-G, Postic-D, Saint-Giorns-I, Boerlin-P, Piffaretti-JC, Assous-M, Grimont-PAD (1992): Delimitation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme Borreliosis. *Int J Sys Bacteriol.* 42: 378-383
10. Barbour-AG, Burgdorfer-W, Hayes-SF, Peter-O, Aeschlimann-A (1983): Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. *Curr Microbiol.* 8: 123-126
11. Barthold-SW, Beck-DS, Hansen-GM, Terwilliger-GA, Moody-KD (1990): Lyme borreliosis in selected strains and ages of laboratory mice. *J Infect Dis.* 162(1): 133-138
12. Baughn-RE, Jorizzo-JL, Adams-CB, Musher-DM (1988): IgG class and subclass responses to *Treponema pallidum* in patients with syphilis. *J Clin Immunol*;8(2), 128-139
13. Bhakdi-S, Muhly-M, Füssle-R (1984), Correlations between toxin binding and hemolytic activity in membran damage by staphylococcal-toxin. *Infect Immun*; 46: 318-323
14. Blenk-H, Dutschak-H, Kley-R, Schleich-T (1995): Erfolgskontrolle einer Langzeitbehandlung bei Lyme-Borreliose mittels-Blottitration. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie: Frankfurt am Main 19.5.1995

15. Bossche-V (1990): Zur Anwendung, zum Prinzip und zur Durchführung der SDS-PAGE und des Western Blots. *Mta*; 5: 11-12
16. Bruckbauer-HR, Preac-Mursic-V, Fuchs-R, Wilske-B (1992): Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*; 11: 224-232
17. Burgdorfer-W, Barbour-AG, Hayes-SF, Benach-JL, Grundwaldt-E, Davis-JP (1982): Lyme disease - a tick borne spirochetosis? *Science* 216: 1317-1319
18. Carlsson-B; Hanson-HS; Wasserman-J; Brauner-A (1991); Evaluation of the fluorescent treponemal antibody-absorption (FTA-Abs) test specificity; *Acta Derm Venereol Stockh.*; 71(4): 306-311
19. Christensson-B, Johansson-H, Oxelius-V (1985): Subclass-specific IgG antibodies to toxic shock syndrome toxin. Imbalance serum IgG subclass pattern in toxic shock syndrome patients; Hanson, Söderström, Oxelius, 1st Int. Symp. On Immunglobulin Subclass Deficiencies. *Monogr. Allergy (Karger, Basel)* 20: 227
20. Clark-EA, Ledbetter-JA (1994): How B and T cells talk to each other. *Nature* 367: 425-428
21. Claus-G, Ebner-H (1982): Statistik für Soziologen, Pädagogen, Psychologen und Mediziner, Band 1: Grundlagen, Harri Deutsch, Thun- Frankfurt am Main
22. Coleman-RM, Nahmias-AJ, Williams-SC, Phillips-DJ, Black-CM, Reimer-CB (1985): IgG subclass antibodies to Herpes simplex Virus. *J Infect Dis* 151: 929-936
23. Craft-JE, Grodzicki-RL, Steere-AC (1984): Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests. *J Infect Dis.* 149; 789-795
24. Dembech-C; Quinti-I; Cimignoli-E; Albi-N; Terenzi-A; Gerli-R; Galandrini-R; Grignani-F; Velardi-A (1992): Human T-helper clones induce IgG production in a subclass-specific fashion. *Cell Immunol.* 1992 Feb; 139(2): 306-317
25. Dietlein-G, Gammel-G (1982): Graphische Darstellung medizinischer Meßgrößen nach der Ordnungsstatistik; *Statistical Software Newsletter*; 8: 130-136
26. Dinerman-H; Steere-AC (1992): Lyme disease associated with fibromyalgia. *Ann Intern Med.*, 117(4): 281-285
27. Dintzis-HM, Dintzis-RZ, Vogelstein-B (1976): Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of the immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 3671-3675
28. Duray-PH, Steere-AC (1988): Clinical pathologic correlations of Lyme disease by stage, *Ann NY Acad Sci* 539, S.65-79
29. Engelsing-AM (1995), Klinik und serologische Diagnostik der Neuroborreliose anhand des Immunoblotverfahrens, Dissertation an der Justus-Liebig Universität Gießen: 37
30. Engelsing-AM (1995), Klinik und serologische Diagnostik der Neuroborreliose anhand des Immunoblotverfahrens, Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Gießen: 42

- 31.Engelsing-AM (1995), Klinik und serologische Diagnostik der Neuroborreliose anhand des Immunoblotverfahrens, Dissertation an der Justus-Liebig-Universität Gießen: 57
- 32.Engstrom-SM; Shoop-E; Johnson-RC (1995): Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *J Clin Microbiol.* 33(2): 419-427
- 33.Fahrer-H; van-der-Linden-SM; Sauvain-MJ; Gern-L; Zhioua-E; Aeschlimann-A (1991): The prevalence and incidence of clinical and asymptomatic Lyme borreliosis in a population at risk. *J Infect Dis.*; 163(2): 305-310
- 34.Fawcett-PT, Gibney-KM, Rose-CD, Dubbs-SB, Doughty-RA (1992): Frequency and specificity of antibodies that crossreact with *Borrelia burgdorferi* antigens. *J Rheumatol*; 19(4): 582-587
- 35.Feder-HM, Gerber-MA, Luger-SW, Ryan-RW (1992): Persistence of serum antibodies to *Borrelia burgdorferi* in patients treated for Lyme disease: *Clin Infect Dis*; 15 :788-793
- 36.Feinstein-A, Richardson-NE, Taussing-MJ (1986): Immunoglobulin flexibility in complement activation. *Immunol Today* 7: 169-174
- 37.Forsberg-P, Ernerdh-J, Ekerfelt-C, Roberg-M, Vrethem-M, Bergstrom-S (1995): The outer surface proteins of Lyme disease spirochetes stimulate T cells to secrete interferon-gamma (IFN-gamma): diagnostic and pathogenic implications. *Clin Exp Immunol.* 101 (3): 453-460
- 38.French-M (1986): Serum IgG subclasses in normal adults. *Monogr Allergy* 19: 169-174
- 39.Frey-AB, Rao-TD (1995): Single exposure of mice to *Borrelia burgdorferi* elicits immunoglobulin G antibodies characteristic of secondary immune response without production of interleukin-4 by immun T cells. *Infect Immun.* 63(7): 2596-2603
- 40.Gerber-MA; Shapiro-ED; Bell-GL; Sampieri-A; Padula-SJ: Recombinant outer surface protein C ELISA for the diagnosis of early Lyme disease. *J Infect Dis.* 1995 Mar; 171(3): 724-727
- 41.Germain-RN, Margulies-DH (1993): The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 11: 403-450
- 42.Goodman-JL; Bradley-JF; Ross-AE; Goellner-P; Lagus-A; Vitale-B; Berger-BW; Luger-S; Johnson-RC: Bloodstream invasion in early Lyme disease: results from a prospective, controlled, blinded study using the polymerase chain reaction. *Am-J-Med.* 1995 Jul; 99(1): 6-12
- 43.Grauballe-PC, Hornsleth-A, Hjelt-K, Krasilnikoff-PA (1986): Detection by ELISA of immunoglobulin G subclass specific antibody response in rotavirus infection in children. *J med Virol* 18 (3): 277-281
- 44.Grundbacher-FJ, Shreffler-DC (1970): Changes in human serum immunoglobulin levels with age and sex. *Z Immun Allergieforsch* 141: 20-26
- 45.Hamilton-RG(1987): Human IgG-subclass measurements in the clinical laboratory. *Clin. Chem.*, 33 (10): 1707-1725

46. Hammarström-L, Granström-M, Oxelius-V, Persson-MAA, Smith-CIE (1984): IgG subclass distribution of anti-teichonic acid and anti-alpha toxin antibodies in normal and immunodeficient donors. *Clin. Exp. Immunol.* 55: 593-601
47. Hammarström-L, Smith-CIE (1986): IgG-Subclasses in bacterial infections. *Monogr Allergy* 19: 122-133
48. Hansen-K, Hinderson-P, Pedersen-NS (1988): Measurement of antibodies to the *Borrelia burgdorferi* flagellum improves serodiagnosis in Lyme disease. *J Clin Microbiol*; 26: 338-346
49. Harding-CV, Roof-RW, Allen-PM, Unanue-ER (1991): Effects of pH and polysaccharides on peptide binding to class II major histocompatibility molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2740-2744
50. Hartung-J, Epelt-B, Klösner-KH (1985): Statistik Lehr- und Handbuch der angewendeten Statistik. R. Oldenbourg-München-Wien
51. Hechemy-KE; Harris-HL; Duerr-MJ; Benach-JL; Reimer-CB (1988): Immunoglobulin G subclasses specific to *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease. *Ann NY Acad Sci.*; 539: 162-169
52. Hofmann-H (1985): Immunoglobuline G subclasses in TBE infection. Conference of the Europeane Group for Rapid Viral Diagnosis, Brussles, September 1985
53. Johnson-BJ; Robbins-KE; Bailey-RE; Cao-BL; Sviat-SL; Craven-RB; Mayer-LW; Dennis-DT (1996): Serodiagnosis of Lyme disease: accuracy of a two-step approach using a flagella-based ELISA and immunoblotting. *J Infect Dis.* 174(2): 346-353
54. Johnson-RC, Schmid-GP, Hyde-FW, Steigerwalt-AG, Brenner-DJ (1984): *Borrelia burgdorferi* sp. no.: etiologic agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol.* 34: 496-497
55. Junker-AK; Tilley-P (1994): Varicella-zoster virus antibody avidity and IgG-subclass patterns in children with recurrent chickenpox. *J med Virol.*; 43(2): 119-124
56. Karlsson-M (1990): Aspects of the diagnosis of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis. Suppl.* 67: 5-41
57. Keller-R (1994): Immunologie und Immunopathologie, Thieme Verlag Stuttgart, New York: 84 , 90
58. Kollaritsch-H; Stock-C; Scheiner-O; Stemberger-H; Wiedermann-G (1990): Immune response in patients with amoebiasis: evaluation of IgG-subclasses. *Int J Med Microbiol.* 272(4): 535-539
59. Kyhse-Andersen-J (1984), *J Biochem Biophys Methods*; 10: 203-209

60. Lämmli-UK (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227:680-685
61. Laman-JD, Claassen-E (1996): T-cell-independent and T-cell-dependent humoral immunity. In Clifford M. Snapper: Cytokine regulation of humoral immunity basic and clinical aspects. Chicester, J. Wiley et Sons Ltd: 23-72
62. Layton-JE, Vitetta-ES, Uhr-JW, Kramer-PH (1984): Clonal analysis of B cells induced to secrete Ig by T-cell derived lymphokine(s). *J Exp Med* 160: 1850-1863
63. Lebech-AM, Hansen-K, Wilske-B, Theisen-M (1994): Taxonomic classification of 29 *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients with Lyme borreliosis: a comparison of five different phenotypic and genotypic typing schemes. *Med Microbiol Immunol* 183: 325-341
64. Linde-A, Hammarström-L, Persson-MAA; Smith-CIE, Sundquist-VA, Wahren-B (1983): Virus-specific antibody activity of different subclasses of immunoglobulin G and A in cytomegalovirus infection. *Infect Immunity* 42: 237-244
65. Lipschütz-B (1913): Über eine seltene Erythemform (Erythema chronicum migrans). *Arch. Derm. Syph. (Berl.)* 118: 349-356
66. Lucius-R, Kern-A, Seeber-F, Pogonka-T, Willenbacher-J, Taylor-HR, Pinder-M, Ghalib-HW, Schulz-Key-H, Soboslay-P (1992): Specific and sensitive IgG4 immunodiagnosis of onchocerciasis with a recombinant 33 kD *Onchocerca volvulus* protein (Ov33). *Trop Med Parasitol.* 43(3): 139-145
67. Magnarelli-LA, Anderson-JF, Johnson-RC (1987): Cross-reactivity in serological tests for Lyme disease and other spirochetal infections. *J Infect Dis.* 156: 183-188
68. Mathiesen-T, Linde-A, Olding-Stenkvis-E, Wahren-B (1988): Specific IgG subclass reactivity in herpes simplex encephalitis. *J Neurol.*; 235(7): 400-406
69. Mathiesen-T, Hammarström-L, Fridell-E, Linde-A, Wirsén-G, Smith-CIE (1990): Aberrant IgG subclass distribution to measles in healthy seropositive individuals, in patients with SSPE and in immunoglobulin-deficient patients. *Clin exp Immunol.* 80: 202-2055
70. Mergener-K, Enzensberger-W, Rubsamen-Waigmann-H, von-Briesen-H, Doerr-HW (1987): Immunoglobulin class- and subclass-specific HIV antibody detection in serum and CSF specimens by ELISA and Western blot. *Infection.*; 15(5): 317-322
71. Miller-LC, Isa-S, Vannier-E, Georgilis-K, Steere-AC, Dinarello-CA (1992): Live *Borrelia burgdorferi* preferentially activate interleukin-1 beta gene expression and protein synthesis over the interleukin-1 receptor antagonist. *J Clin Invest.* 90(3): 906-912
72. Modlin-RL (1994): Th1-Th2 paradigm: Insights from leprosy. *J Invest Dermatol* 102: 828
73. Mond-JJ, Brunswick-M (1987): A role for IFN- γ and NK-cells in immune responses to T-cell regulated antigens type 1 and 2. *Immunol Rev* 99:105-118

74. Morell-A, Roth-Wicky-B, Skvaril-F (1983): Immunglobulin G subclass restriction of antibodies against hepatitis b surface antigen. *Infect-Immun*, 39: 565-568
75. Mosmann-TR, Cherwinski-H, Bond-MW, Giedlin-MA, Coffman-RL (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 36: 2348
76. Noelle-RJ, Roy-M, Shepherd-DM (1992): A novel ligand on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for the cognate activation of B-cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6550-6554
77. Olsson-I; Hammarstrom-L; Smith-CI; Hovmark-A; Asbrink-E (1987): IgG subclasses of specific antibodies in Ixodes ricinus-borne borreliosis. *Clin Exp Immunol.*; 69(3): 618-623
78. Parker-DC (1993): T cell-dependent B cell activation. *Ann Rev Immunol* 11: 331-360
79. Parker-DC, Purkerson-JM (1996): B-cell activation and maturation to immunglobulin secretion. In: Snapper-CM: Cytokine regulation of humoral immunity: basic and clinical aspects. Chicester J.Wiley et Sons Ltd 1996: 99-108
80. Paul-H, Gerth-HJ, Ackermann-R (1987): Infectiousness for humans of Ixodes ricinus containing *Borrelia burgdorferi*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 263: 473-476
81. Peng-ZK, Naclerio-RM, Norman-PS, Adkinson-NF Jr (1992): Quantitative IgE- and IgG-subclass responses during and after long-term ragweed immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 89(2): 519-529
82. Pfister-HW, Neubert-U, Wilske-B, Preac-Mursic-V, Einhäupl-KM, Borasio-GD (1986): Reinfection with *Borrelia burgdorferi*. *Lancet* II: 984-985
83. Pierce(1989). BCA Protein Assay Reagent: Gebrauchsanleitung für die Proteingehaltbestimmung der Firma Pierce.
84. Preac-Mursic-V, Wilske-B, Schierz-G, Pfister-HW, Einhäupel-K (1984): Repeated isolation of spirochetes from the cerebrospinal fluid of a patient with meningoradiculitis Bannwarth [letter]. *Eur J Clin Microbiol*; 3: 564-565
85. Preac-Mursik-V, Wilske-B, Herzer-P, Schierz-G, Bauer-M (1986). European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and thicks culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*; 263:112-118
86. Radbruch-A, Muller-W, Rajewsky-K (1986): Class switch recombination is IgG1 specific on active and inactive IgH loci of IgG1-secreting B-cell blasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3954-3957
87. Reik-L, Steere-AC, Barthagen-NH, Shope-RE, Malawista-SE (1979): Neurologic abnormalities of Lyme disease. *Medicine (Baltimore)*; 58: 281-294
88. Roitt-IM (1988): „Leitfaden der Immunologie“, Darmstadt: 43

89. Rose-CD, Fawcett-PT, Singsen-BH, Dubbs-SB, Doughty-RA (1991): Use of Western Blot and Enzyme-Linked Immunosorbent Assays to assist in the diagnosis of Lyme disease. *Pediatrics* 88: 465-470
90. Rubin-RL, Tang-FL, Chan-EKL, Pollard-KM, Tsay-G, Tan-EM (1986): IgG subclasses of autoantibodies in systemic Lupus erythematosus, Sjogren's syndrome, and Drug-induced autoimmunity. *J Immunol* 137: 2528-2534
91. Russel-H, Sampson-JS, Schmid-GP, Wilkinson-HW, Plikaytis-B (1984): Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. *J Infect. Dis.*; 149: 465-470
92. Salimonou-IS, Williams-AIO, Osunkoya-BO (1982): IgG subclass levels in malarian-infected Nigerians. *Vox Sang* 42: 248
93. Satz-N (1992): Immunologie und diagnostische Testverfahren bei der Lyme-Borreliose. *Schweiz. Med. Wschr.*; 122: 1779-1791
94. Schoenfeld-R, Araneo-B, Ma-Y, Yang-LM, Weiss-JJ (1992): Demonstration of a B-lymphocyte mitogen produced by the Lyme disease pathogen, *Borrelia burgdorferi*. *Infect-Immun.* 60(2):455-464
95. Schulze-J, Briesen-v.H, Hansen-Hübner-C, Brade-V (1995): Induktion von Zytokinproduktion humaner Monozyten durch *Borrelia burgdorferi* Isolate. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie: Frankfurt am Main 19.5.1995
96. Seppelä-IJT, Routonen-N, Sarnesto-A, Mattilla-PA, Mäkelä-O (1984): The percentage of six immunoglobulin isotypes in human antibodies to tetanus toxoid: standardization of isotype-specific second antibodies in solid-phase assay. *Eur J Immunol* 14: 868-875
97. SIA™ Lyme Disease Prozedur-Nr. SIA123
98. Sondergaard-I, Poulsen-LK, Osterballe-O, Weeke-B (1991): A computational approach to the description of individual immune responses. IgE and IgG-subclass allergen-specific antibodies formed during immunotherapy. *Allergy.* 46 (1): 10-19
99. Sondergaard-I, Poulsen-LK, Osterballe-O, Weeke-B (1992): Evidence of a common regulation of IgE and IgG-subclass antibodies in humans during immunotherapy. *Allergy.* 47(5): 467-470
100. Steere-AC, Malawista-SE, Snyder-DR, Andiman-WA (1976): A cluster of arthritis in children and adults in Lyme, Connecticut. *Arthritis Rheum*; 19: 824
101. Steere-AC, Malawista-SE, Hardin-JA, Ruddy-S, Askenase-W, Andiman-WA (1977): Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: the enlarging clinical spectrum. *Ann Intern Med*; 86: 685-698
102. Steere-AC, Gibofsky-A, Patarroyo-ME, Winchester-RJ, Hardin-JA, Malawista-SE (1979): Chronic Lyme Arthritis. Clinical and immunogenetic differentiation from rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.* 90: 896-901
103. Steere-AC, Malawista-SE, Newman-JH, Spieler-PN, Bartenhagen-NH (1980): Antibiotic therapy in Lyme disease. *Ann Intern Med*; 93: 1-8

104. Steere-AC, Grodzicki-RL, Craft-JE, Shrestha-M, Kornblatt-AN, Malawista-SE (1984): Recovery of Lyme disease spirochetes from patients. *Yale J Biol Med.* 57: 557-560
105. Stein-KE (1992): Thymus-independent and thymus-dependent response to polysaccharide antigens. *J Infect Dis* 165: 49-52
106. Subbarao-B, Garg-M (1994): Thymus-independent antigens. In: Snow-C (ed.) *Handbook of T and B lymphocytes.* San Diego: Academic Press: 343-370
107. Sundquist-VA, Linde-A, Wahren-B (1984): Virus-specific immunoglobulin G subclasses in herpes simplex and varicella zoster virus infection. *J Clin Microbiol* 20: 94-98
108. Torgano-G; Vecchi-M; Arosio-E; Santambrogio-D; Ronchi-G; Annoni-G; Tomasini-M; Contessini-E; de-Franchis-R (1992): Changes of IgG-bearing cell populations in the portal tracts of patients with chronic liver disease of viral etiology: an evaluation by immunoperoxidase method and computerized image analysis. *Hepatology.*; 16(1): 19-23
109. Towbin-H, Staehlin-T, Gordon-J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Proc Natl Acad Sci,* 76: 4350-4354
110. Urbanek-R; Dold-S (1986): [The key role of IgG4 subclass antibodies in the development of protection against allergic reactions to insect stings]. *Monatsschr-Kinderheilkd* 134(8): 536-540
111. van-der-Linde-MR (1991): Lyme carditis: clinical characteristics of 105 cases. *Scand J Infect Dis Suppl.* 77: 81-84
112. Wallich-R, Helmes-C, Schaible-UE, Simon-MM, Moter-SE, Kramer-MD (1993): Genotypische Variation bei *Borrelia burgdorferi*: Konsequenzen für die molekularbiologische Diagnostik. *Lab. Med.* 17: 269-276
113. Watanakunakorn-C; Toliver-J Jr (1992): Lyme arthritis with subarticular cyst formation in metacarpal and metatarsal bones. *South Med J.* 85(2): 187-188
114. Weber-K, Schierz-G, Wilske-B, Neubert-U, Krampitz-HE, Barbour-AG, Burgdorfer-W (1986): Reinfection in erythema migrans disease. *Infection* 14: 38-41
115. Wilske-B, Preac-Mursic-V, Schierz-G, Kühbeck-R, Barbour-AG, Kramer-M (1988): Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Ann NY Acad Sci* 539: 126-143
116. Wilske-B, Steinhuber-R, Bergmeister-H, Fingerle-V, Schierz-G, Preac-Mursic-V, Vanek-E, Lorbeer-B (1987): Lyme-Borreliose in Süddeutschland. *Dtsch med Wschr.* 112:1730-1736
117. Winward-KE, Smith-JL (1989): Ocular disease in caribbean patients with serologic evidence of lyme borreliosis. *J Clin Neuro-Ophthalmology;* 9(2): 65 -70
118. Yamakoshi-T (1992): [Inhibitory activity of mite IgG4, antibody on antigen-induced histamine release from human peripheral blood leukocytes] *Nippon-Jibiinkoka-Gakkai-Kaiho.* 95(7): 996-1004

119. Yssel-H, Nakamoto-T, Schneider-P, Freitas-V, Collins-C, Webb-D, Mensi-N, Soderberg-C, Peltz-G (1990): Analysis of t lymphocytes cloned from the synovial fluid and blood of a patient with lyme arthritis. *Int Immunol.* 2 (11): 1081-1089
120. Yssel-H, Shanafelt-MC, Soderberg-C, Schneider-PV, Anzola-J, Peltz-G (1991): *Borrelia burgdorferi* activates a t helper type 1-like t cell subset in lyme arthritis. *J Exp Med.* 174(3): 593-601
121. Ziehlen-S, Ahrens-P, Kotitschle-R, Riebartsch-C, Bauscher-P, Hofmann-D (1990): IgG-Subklassenspiegel bei gesunden Kindern. *Monatsschr-Kinderheilkd.* 138(7): 377-380
122. Zumstein-G, Fuchs-R, Hofmann-A, Preac-Mursic-V, Soutschek-E, Wilske-B (1992): Genetic polymorphism of the gene encoding the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi*. *Med Microbiol Immunol* 181: 57-70

9. Anhang

Anhang 1: Reagenzien zur Durchführung des ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

(a) Verdünnungsmedium	gepufferte Proteinlösung, Absorbtionsmittel, pH 7,5; Sigma, Nr. S 4646
(b) Positiv-Kontrolle	Menschliches Serum mit Antikörpern gegen <i>Borrelia burgdorferi</i> ; Sigma, Nr. P 6049
(c) Labor-Kontrolle	Menschliches Serum mit Antikörpern gegen <i>Borrelia burgdorferi</i> ; Borrelien-Labor Prof. Dr. Wellensiek, Mikrobiologisches Institut der Justus-Liebig Universität Gießen
(d) Negativ-Kontrolle	Menschliches Serum ohne nachweisbare Antikörper gegen <i>Borrelia burgdorferi</i> ; Sigma, Nr. 6267
(e) Mikrotitergefäße	mit <i>Borrelia burgdorferi</i> -Antigen (Stamm B ₃₁) beschichtete Mikrotitergefäße; Sigma, Nr. A 0803
(f) Waschpuffer	Konzentrierte Pufferlösung; Sigma, Nr. W 3875 1:100 mit sterilem bidestilliertem Wasser verdünnt
(g) Detektionsantikörper	Ziegen-Antikörper gegen menschliches IgM und IgG, markiert mit alkalischer Phosphatase (Kalb); Sigma, C 5543
(h) Substrat	Natrium-P-Nitrophenylphosphat, 1 mg/ml in gepufferter Lösung, pH 9,6; Sigma Nr. S 3516
(i) Stopplösung	Alkalische Lösung, pH 12; Sigma, Nr. S3891

Anhang 2: Reagenzien zur Herstellung des Borrelien-Antigens

(a) BKS-Medium	
	5 g Neopepton, DIFCO Nr. 0119-01
	6 g Hepes (kristalin), Serva Nr. 25245
	0,7 g Zitronensäure, Serva Nr. 38642
	0,8 g Brenztraubensäure (Pyruvat), Serva Nr. 15220
	2,2 g NaHCO ₃ , Merck Nr. 6329
	0,4 g N-Acetylglucosamin, Sigma N. A-8625
	5 g Glucose, Merck Nr. 8342
	100 ml Flüssigmedium CMRL 1066 (10x), Gibco Nr. 042-01540
	3,4 ml Glutamin-Lösung, Serva Nr. 47245
	in 300 ml sterilem bidestilliertem Wasser lösen, pH auf 7,6 einstellen und auf 500 ml auffüllen.
	200 ml 7% Gelatine (autoklaviert), Merck Nr. 4070
	72 ml steriles Kaninchenserum (KNS), Firma Heinrich Uthmann Kg in Vermold
	70 ml Rinderserumalbumin, Sigma Nr. A-7409

Anschließend wird die Lösung steril filtriert.

(b) Borrelien-Waschpuffer

Die Angaben in eckiger Klammer entsprechen den Endkonzentrationen

[0,02 M]	2 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Merck Nr. 8382
[0,13 M]	NaCl, Merck Nr.6404
[0,5 mM]	MgCl ₂ x 6 H ₂ O [25 mM], Merck Nr. 5833
[0,01 M]	Dithioerythriol (DTE), Serva Nr. 20697

Als Lösungsmittel wurde steriles bidestilliertes Wasser verwendet.

(c) Solubilisierungslösung für das Borrelien Antigen

0,2 g	Dithioerythriol (DTE), Serva Nr. 20697
1,0 ml	20% Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS), Pierce Nr. 28312
100 µl	0,1 M Phenylmethyl-Sulfonyl Fluorid (PMSF), Sigma Nr. P-7626 in Isopropylalkohol, Fluka AG Nr. 59300
1,5 g	Saccharose, Merck Nr. 7653
10 ml	Antigen-Suspension (Produkt der Antigen Herstellung)

Anhang 3: Reagenzien zur Herstellung und Durchführung des IFT

Endkonzentrationen in eckigen Klammern

(a) Borrelien-Waschpuffer zur Herstellung des IFT

11,92 g [0,05 M]	N(2-Hydroxyethyl) piperazin-N'-2-Ethansulfon-Säure (Hepes), von Serva, Nr. 25245
0,20 g [1 mM]	MgCl ₂ * 6 H ₂ O, Merck Nr. 5833
0,15 g [1 mM]	CaCl ₂ * 2 H ₂ O, Merck Nr. 2382
200µl [1 mM]	Gentamycin 500x Stammlösung, Boehringer Nr.1059 467
ad 1000 ml	physiologische Kochsalz-Lösung

(b) Suspensionspuffer

11,92 g [0,05 M]	N(2-Hydroxyethyl) piperazin-N'-2-Ethansulfon-Säure (Hepes), von Serva, Nr. 25245
0,20 g [1 mM]	MgCl ₂ * 6 H ₂ O, Merck Nr. 5833
0,15 g [1 mM]	CaCl ₂ * 2 H ₂ O, Merck Nr. 2382
0,2 g [0,2%]	Gelatine, Merck Nr. 4070
0,015 g [0,15%]	Dithioerythritol (DTE), Serva Nr. 20697
ad 100ml	pysiologische Kochsalz-Lösung

(c) Fixier-Lösung

20 ml	100% Methanol, Merck Nr. 6009
20 ml	100% Aceton, Merck Nr. 22

(d) 10-fach konzentrierte Posphate Buffered Saline (PBS)

151,94 g	NaCl, Merck Nr.6404
12,48 g	NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat), Merck Nr. 6345
56,95 g	Na ₂ HPO ₄ (Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat), Merck Nr. 6580
ad 2000 ml	sterilem bidestilliertem Wasser, auf pH 7,2 eingestellt

(e) Absorptionslösung

Ultrasorbent,

Sonikat aus *Treponema phagedenis*, lyophilisiert, mit sterilem Wasser rekonstruiert, BAG in Lich

(f) Anti-Human-IgA, -IgM, -IgG-Antikörper vom Kaninchen von Dako, Hamburg Code-Nr: F0200

Anhang 4: Reagenzien zur Durchführung des IgM- und IgG- Westernblots

Die Endkonzentrationen sind in eckigen Klammern angegeben.

- (a) Trenngel 12 ml Acrylamidlösung
(300 g Acrylamid, Serva Nr.10675; 4,8 g Bisacrylamid, Serva Nr. 29195; ad 100 ml sterilem bidestilliertem Wasser)
- 8 ml 2 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Merck Nr. 8382 in 8 M Harnstoff Merck Nr. 8486 (pH8,9)
- 19 ml 8 M Harnstoff, Merck Nr. 8486 (pH8,9)
- 400 µl 20% Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS), Pierce Nr. 28312
- 40 µl TEMED, Serva Nr. 35925
- 250 µl 100 mg Ammoniumperoxodisulfat (APS),
Merck Nr. 1201 in 1 ml 8 M Harnstoff

- (b) Sammelgel 2 ml Acrylamidlösung
(50 g Acrylamid, Serva Nr.10675; 1,5 g Bisacrylamid, Serva Nr. 29195; ad 100 ml sterilem bidestilliertem Wasser)
- 2 ml 2 M Tris (vergl. a)
- 16 ml 8 M Harnstoff (vergl. a)
- 200 µl 20% SDS (vergl. a)
- 150 µl APS (vergl. a)

(c) standardisierte Proteine; Low Molecular Weight (LMW) Proteine, Pharmacia Nr. 17-0446-01

Protein	Molekulargewicht in kilo-Dalton	Herkunft
Phosphorylase b	94 000	Hasenmuskel
Albumin	67 000	Rinderserum
Ovalbumin	43 000	Eiweiß
Karbonische Anhydrase	30 000	Rinder-Erythrozyt
Trypsininhibitor	20 100	Sojabohnen
a-Lactalbumin	14 400	Rindermilch

(d) Kathodenpuffer

18 ml

Lämmli-Puffer

(121 g Tris, Merck Nr. 8382; 576 g Glycin, Serva Nr. 23390; 4 g Natriumazid, Merck Nr. 6688; ad 4000 ml sterilem bidestilliertem Wasser)

15 ml

20% SDS (vergl. a)

750 ml

steriles bidestilliertes Wasser

(e) Anodenpuffer

800 ml

Lämmli-Puffer (vergl.d) ad 4000 ml sterilem bidestilliertem Wasser

(f) Bromphenolblau		
	1 g	Bromphenolblau, Merck Nr.8122
	100 ml	Lämmli-Puffer (vergl.d)
(g) Coomassieblau		
	450 ml	100% Methanol, Merck nr. 6009
	100 ml	100% Eisessig, Merck Nr. 63
	450 ml	steriles bidestilliertes Wasser
	2 g	Servablau R, Serva Nr. 35051
(h) Blot-Puffer	6 g	Tris [0,05 M], Merck Nr. 8382
	3 g	Glycin [0,04 M], Serva Nr. 23390
	200 ml	Methanol [20%], Merck 6009
	ad 1000 ml	sterilem bidestilliertem Wasser
(i) 10-fach konzentriertes Posphate Buffered Saline (PBS)		
	151,94 g	NaCl, Merck Nr.6404
	12,48 g	NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat), Merck Nr. 6345
	56,95 g	Na ₂ HPO ₄ (Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat),Merck Nr. 6580
	ad 2000 ml	sterilem bidestilliertem Wasser, auf pH 7,2 eingestellt
(j) Amidoschwarz 5 g		Amidoschwarz 10 B,Serva Nr. 12310
	500 ml	100% Methanol, Merck Nr. 6009
	100 ml	100% Eisessig, Merck Nr. 63
	ad 100 ml	sterilem bidestilliertem Wasser
(k) Entfärber	450 ml	100% Methanol, Merck Nr. 6009
	100 ml	100% Eisessig, Merck Nr. 63
	450 ml	steriles bidestilliertes Wasser
(l) Blockierlösung		
	2,42 g	Tris [20 mM], Merck Nr. 8382
	29,2 g	NaCl [500 mM],Merck Nr. 6404
	5 g	ε-Aminocaprinsäure [0,5%], Sigma Nr. A-2504
	1 g	Gelatine [0,1%], Merck Nr. 4070
	in ca. 800 ml	sterilem bidestilliertem Wasser gelöst und 30 Minuten in den Dampftopf, auf pH 7,5 eingestellt
	100 ml	fetales Kälberserum (FKS) [10%], Seromed Biochrom KG Nr.S0115
	1 ml	Phenylmethylylsulfonylfluorid (PMSF) [0,1 mM], Sigma Nr.P 7626
	2 ml	Gentamycin (500x) [0,1 mg/ml], Böhringer Mannheim Nr. 1059467
	ad 1000 ml	sterilem bidestillierten Wasser
(m) Blot-Waschlösung		
	2,42 g	Tris [20 mM], Merck Nr. 8382
	29,2 g	NaCl [500 mM], Merck Nr. 6404
	ad 1000 ml	sterilem bidestilliertem Wasser, auf pH 7,5 eingestellt

(n) Entwickler

Lösung 1:	100 mg	Carbazol, Sigma Nr. A5754
	12,5 ml	Dimethylformamid, Merck Nr. 3034
Lösung 2:	250 ml	Peroxidase-Färbe-Puffer (6,8 g 50mM Natriumacetat, Merck Nr.6268; 1,8 ml Eisessig, Merck Nr. 63; ad 1000 ml sterilem bidestilliertem Wasser)
	125 µl	30% Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), Merck Nr. 8597

Die beiden Lösungen werden kurz vor der Färbung zusammengeführt.

(o) Absorptionslösung

100µl	Ultrasorbent, Sonikat aus <i>Treponema phagedenis</i> , lyophilisiert, mit sterilem Wasser rekonstruiert, BAG in Lich
-------	---

(p) IgM-Detektionsantikörper Peroxidase markierter Anti-Human-IgM-Antikörper vom Kaninchen, Dakopatts, Code No. P 215

(q) IgG-Detektionsantikörper Peroxidase markierter Anti-Human-IgG- Antikörper vom Kaninchen, Dakopatts, Code No. P 214

Anhang 5: Reagenzien zur Durchführung des IgG-Subklassen Westernblots**- mit polyklonalen Antikörpern**

(a) Westernblot

Trenngel	12 ml	Acrylamidlösung (300 g Acrylamid, Serva Nr.10675; 4,8 g Bisacrylamid, Serva Nr. 29195; ad 100 ml sterilem bidestilliertem Wasser)
	8 ml	2 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Merck Nr. 8382 in 8 M Harnstoff Merck Nr. 8486 (pH8,9)
	19 ml	8 M Harnstoff, Merck Nr. 8486 (pH8,9)
	400 µl	20% Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS), Pierce Nr. 28312
	40 µl	TEMED, Serva Nr. 35925
	250µl	100 mg Ammoniumperoxodisulfat (APS), Merck Nr. 1201 in 1 ml 8 M Harnstoff
Sammelgel	2 ml	Acrylamidlösung (50 g Acrylamid, Serva Nr.10675; 1,5 g Bisacrylamid, Serva Nr. 29195; ad 100 ml sterilem bidestilliertem Wasser)
	2 ml	2 M Tris (vergl. a)
	16 ml	8 M Harnstoff (vergl. a)
	200µl	20% SDS (vergl. a)
	150 µl	APS (vergl. a)

(c) Verdünnungsmedium

2,42 g	Tris [20 mM], Merck Nr. 8382
29,2 g	NaCl [500 mM], Merck Nr. 6404
5 g	ε-Aminocapronsäure [0,5%], Sigma Nr. A-2504
1 g	Gelatine [0,1%], Merck Nr. 4070
in ca. 800 ml	sterilem bidestilliertem Wasser gelöst und 30 Minuten in den Dampfopf, auf pH 7,5 eingestellt

- | | |
|------------|--|
| 100 ml | fetales Kälberserum (FKS) [10%], Seromed Biochrom KG Nr.S0115 |
| 1 ml | Phenylmethylylsulfonylfluorid (PMSF) [0,1 mM], Sigma Nr.P 7626 |
| 2 ml | Gentamycin (500x) [0,1 mg/ml], Böhringer Mannheim Nr. 1059467 |
| ad 1000 ml | sterilem bidestillierten Wasser |
- (c) Absorptionslösung
100µl
Ultrasorbent, Sonikat aus *Treponema phagedenis*, lyophilisiert, mit sterilem Wasser rekonstruiert, BAG in Lich
- (d) Blot-Waschlösung
2,42 g Tris [20 mM], Merck Nr. 8382
29,2 g NaCl [500 mM], Merck Nr. 6404
ad 1000 ml sterilem bidestilliertem Wasser, auf pH 7,5 eingestellt
- (e) Subklassen Antikörper
- | | |
|-----------|--|
| Anti IgG1 | polyklonaler anti-Human IgG1 Antikörper vom Schaf;
von Nordic Produkt Nr.: ShAHu/IgG1-4 |
| Anti-IgG2 | polyklonaler anti-Human IgG2 Antikörper vom Schaf;
von Nordic Produkt Nr.: ShAHu/IgG1-4 |
| Anti-IgG3 | polyklonaler anti-Human IgG3 Antikörper vom Schaf;
von Nordic Produkt Nr.: ShAHu/IgG1-4 |
| Anti-IgG4 | polyklonaler anti-Human IgG4 Antikörper vom Schaf;
von Nordic Produkt Nr.: ShAHu/IgG1-4 |
- (f) Färbeantikörper
Immunological
anti-Schaf IgG Antikörper vom Kaninchen, Peroxidase markiert, von Nordic Laboratories, Produkt Nr.: RASh/IgG
- (g) Entwickler
- | | | |
|-----------|---------|--|
| Lösung 1: | 100 mg | Carbazol, Sigma Nr. A5754 |
| | 12,5 ml | Dimethylformamid, Merck Nr. 3034 |
| Lösung 2: | 250 ml | Peroxidase-Färbe-Puffer
(6,8 g 50mM Natriumacetat, Merck Nr.6268; 1,8 ml Eisessig, Merck Nr. 63;
ad 1000 ml sterilem bidestilliertem Wasser) |
| | 125 µl | 30% Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), Merck Nr. 8597 |
- Die beiden Lösungen werden kurz vor der Färbung zusammengeführt.
- mit monoklonalen Antikörpern**
- (h) Tris-Tween-0,05%-AP-Puffer pH 7,4
- | | | |
|--|----------|--|
| | 121,14 g | Tris [1 M], Merck Nr. 8382 |
| | 58,44 g | NaCl [1 M], Merck Nr. 6404 |
| | 5,08 g | MgCl ₂ x 6 H ₂ O [25 mM], Merck Nr. 5833 |
| | 2,00 g | NaN ₃ [2%], Merck Nr. 822335 |
- ad 1000 ml pH 7,4 (1 N HCl)
- Die Stammlösung mit sterilem H₂O bidestilliert 1:10 vorverdünnen und
1 ml 1:2 vorverdünntes Tween 20 pro Liter hinzugeben (Tween-Konzentration 0,05%).

Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat), von Merck Nr. 822184

(j) Anti-IgG-Antikörper Maus-Anti-Human IgG unmarkiert, von Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
Produkt Nr.: O 421, enthält: 0,05M Tris-HCl; 0,1 M NaCl, 1mM MgCl₂, 15 mM NaN₃; 1% BSA;
pH 7,2

(k) Subklassen-Antikörper:

Anti IgG1 monoklonaler anti-Human IgG1 Antikörper aus Maus-Aszites-Flüssigkeit Klon: HP-6001; von
Sigma Immuno Chemicals Nr. I-9388

Anti-IgG2 monoklonaler anti-Human IgG2 Antikörper aus Maus-Aszites-Flüssigkeit Klon: HP-6002; von
Sigma Immuno Chemicals Nr. I-9513

Anti-IgG3 monoklonaler anti-Human IgG3 Antikörper aus Maus-Aszites-Flüssigkeit Klon: HP-6050; von
Sigma Immuno Chemicals Nr. I-7260

Anti-IgG4 monoklonaler anti-Human IgG4 Antikörper aus Maus-Aszites-Flüssigkeit Klon: HP-6025; von
Sigma Immuno Chemicals Nr. I-7385

(l) Färbeantikörper:

Anti-Maus-IgG Antikörper vom Kaninchen, alkalische Phosphatase markiert; von Dako GmbH,
Hamburg, Deutschland Produkt Nr.: D 31401, enthält: 0,05M Tris-HCl; 0,1 M NaCl, 1mM MgCl₂,
15 mM NaN₃; 1% BSA; pH 7,2

(m) Tris-AP-Puffer pH 9,5; 5-fach

60,57 g	Tris [1 M], Merck Nr. 8382
29,22 g	NaCl [0,5 M],
5,08 g	MgCl ₂ x 6 [25 mM],
ad 1000 ml	pH 9,5 (1 N HCL)

Entwickler für Alkalische Phosphatase:

(n) Lösung 1: 150 mg NBT (Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid); von Serva, Nr. 30550
450 ml Tris-AP-Puffer pH 9,5 (vergl.f)

Diese Stammlösung ist im Kühlschrank lichtgeschützt 1 Monat lang haltbar.

(o) Lösung 2: 5 mg BCIP (5-Brom 4-Chlor-3-Indoxylphosphat-Natrium-Salz) von Serva, Nr. 15259
1 ml bidestilliertes H₂O

Diese Lösung kann in größeren Mengen angesetzt werden und in kleinen Portionen eingefroren werden.

Anhang 6: Reagenzien des LD NK-Combikit (NK001) zur nephelometrischen IgG-Subklassen-

Bestimmung

- | | |
|--|---|
| (a) Antiseren gegen
IgG-Subklasse 1 | Monospezifisches Antiseren-Lyophilisat gegen IgG1;
von LD Labor Diagnostika, Best.Nr.: NK006 |
| (b) Antiseren gegen
IgG-Subklasse 2 | Monospezifisches Antiseren-Lyophilisat gegen IgG2;
von LD Labor Diagnostika, Best.Nr.: NK007 |
| (c) Antiseren gegen
IgG-Subklasse 3 | Monospezifisches Antiseren-Lyophilisat gegen IgG3;
von LD Labor Diagnostika, Best.Nr.: NK008 |
| (d) Antiseren gegen
IgG-Subklasse 4 | Monospezifisches Antiseren-Lyophilisat gegen IgG4;
von LD Labor Diagnostika, Best.Nr.: NK009 |
| (e) IgG-gesamt Antiserum | Antiserum Gesamt-IgG flüssig, gebrauchsfertig
von LD Labor Diagnostika, Best.Nr.: NK001 |
| (f) Kalibrator | Humanes Serum mit kontrolliertem IgG-Subklassen-Gehalt
von LD Labor Diagnostika, Best.Nr.: NK001 |

- (g) positiv Kontrolle Positives Kontrollserum, human, flüssig, gebrauchsfertig
von LD Labor Diagnostika, Best.Nr.: NK001
- (h) aqua destilata Zur Rekonstruktion der lyophilisierten Antiseren
von LD Labor Diagnostika, Best.Nr.: NK001

Die Reagenzien enthalten als Konservierungsmittel 0,1% Natriumazid und 0,01% Thiomersal.

Anhang 7: Standardreagenzien des Behring Nephelometer zur nephelometrischen IgG- Subklassen

Bestimmung

- (a) N Reaktionspuffer: Lösung von Polyethylenglycol und Natriumchlorid (11,6 g/l) in Phosphat-Puffer
(0,05 mol/l)
Konservierungsmittel: Natriumazid (<1 g/l)
- (b) N Diluent: Phosphatgepufferte Natriumchlorid-Lösung
Konservierungsmittel: Natriumazid (<1 g/l)

Anhang 8: Testansätze nach den Angaben von LD Labor Diagnostika

Testansatz zu Bestimmung des IgG-Gesamtgehaltes eines Serums

Test Nummer			
Test Name	IgG total	Kurzbezeichnung	IgG
Proben Vol. [ul]	30	Proben Verdünnung 1:	100,0
		Minimale Verdünnung	20,0
Reagenz 1 Vol. 1 [ul]	40	Human IgG	
Reagenz 2 Vol. [ul]	0		
Puffer Vol. 1	100	N Reaktionspuffer	
Puffer Vol. 2	60		
Meßzeit [min]	6	fixed time	
Standard-Serum		LD-Calibrator	
Erste Verdünnung 1:	80,0		
Erlaubte Abweichung [%]	5,0		
Gültigkeit [Tage]	7		
Konzentrations Einheit	mg/l		
Meßbereich [mg/l]			
Untere Grenze	861,00		
Obere Grenze	13781,00		

Testansatz zur Bestimmung des IgG1-Gehaltes eines Serums

Test Nummer			
Test Name	IgG Subkl. 1	Kurzbezeichnung	IgG1
Proben Vol. [ul]	30	Proben Verdünnung 1:	100,0
		Minimale Verdünnung	5,0
Reagenz 1 Vol. 1 [ul]	40	Anti- IgG1	
Reagenz 2 Vol. [ul]	0		
Puffer Vol. 1	70	N Reaktionspuffer	
Puffer Vol. 2	70		
Meßzeit [min]	6	fixed time	
Standard-Serum		LD-Calibrator	
Anzahl Punkte bei Mehrpunktkalibrierung	6		
Erste Verdünnung 1:	20,0		
Erlaubte Abweichung [%]	10,0		
Gültigkeit [Tage]	7		
Konzentrations Einheit	mg/l		
Meßbereich [mg/l]			
Untere Grenze	895,00		
Obere Grenze	28640,00		

Testansatz zur Bestimmung des IgG2-Gehaltes eines Serums

Test Nummer			
Test Name	IgG Subkl. 2	Kurzbezeichnung	IgG2
Proben Vol. [ul]	30	Proben Verdünnung 1:	100,0
		Minimale Verdünnung	5,0
Reagenz 1 Vol. 1 [ul]	40	Anti- IgG2	
Reagenz 2 Vol. [ul]	0		
Puffer Vol. 1	70	N Reaktionspuffer	
Puffer Vol. 2	70		
Meßzeit [min]	6	fixed time	
Standard-Serum		LD-Calibrator	
Anzahl Meßpunkte bei Mehrpunktkalibrierung	6		
Erste Verdünnung 1:	10,0		
Erlaubte Abweichung [%]	10,0		
Gültigkeit [Tage]	7		
Konzentrations Einheit	mg/l		
Meßbereich [mg/l]			
Untere Grenze	879,00		
Obere Grenze	28140,00		

Testansatz zur Bestimmung des IgG3-Gehaltes eines Serums

Test Nummer			
Test Name	IgG Subkl. 3	Kurzbezeichnung	IgG3
Proben Vol. [ul]	40	Proben Verdünnung 1:	20,0
		Minimale Verdünnung	5,0
Reagenz 1 Vol. 1 [ul]	40	Human IgG	
Reagenz 2 Vol. [ul]	0		
Puffer Vol. 1	70	N Reaktionspuffer	
Puffer Vol. 2	70		
Meßzeit [min]	6	fixed time	
Standart-Serum		LD-Calibrator	
Anzahl Meßpunkte bei Mehrpunktkalibrierung	5		
Erste Verdünnung 1:	5,0		
Erlaubte Abweichung [%]	10,0		
Gültigkeit [Tage]	7		
Konzentrations Einheit	mg/l		
Meßbereich [mg/l]			
Untere Grenze	96,00		
Obere Grenze	1536,00		

Testansatz zur Bestimmung des IgG4-Gehaltes eines Serums

Test Nummer			
Test Name	IgG Subkl. 4	Kurzbezeichnung	IgG4
Proben Vol. [ul]	25	Proben Verdünnung 1:	20,0
		Minimale Verdünnung	5,0
Reagenz 1 Vol. 1 [ul]	40	Human IgG	
Reagenz 2 Vol. [ul]	0		
Puffer Vol. 1	70	N Reaktionspuffer	
Puffer Vol. 2	70		
Meßzeit [min]	6	fixed time	
Standard-Serum		LD-Calibrator	
Anzahl Meßpunkte bei Mehrpunktkalibrierung	5		
Erste Verdünnung 1:	5,0		
Erlaubte Abweichung [%]	10,0		
Gültigkeit [Tage]	7		
Konzentrations Einheit	mg/l		
Meßbereich [mg/l]			
Untere Grenze	102,00		
Obere Grenze	1636,00		

Anhang 9: Abkürzungsverzeichnis

• Acrodermatitis chronica atrophicans	ACA
• Alkalische Phosphatase	AP
• Borrelia burgdorferi, Stamm B31	B ₃₁
• Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay	ELISA
• Erythema chronicum migrans	ECM
• Granulozyten- und Makrophagen-Kolonie-Stimmulierender-Faktor	GM-CSF
• Immunglobulin D	IgD
• Immunglobulin E	IgE
• Immunglobulin M	IgM
• Immunglobulin G	IgG
• Immunglobulinsubklasse G 1	IgG1
• Immunglobulinsubklasse G2	IgG2
• Immunglobulinsubklasse G3	IgG3
• Immunglobulinsubklasse G4	IgG4
• Immunfluoreszenz-Test	IFT
• Immunfluoreszenz-Test absorbiert	IFT-Abs
• Interferon- γ	INF- γ
• Interleukin 1 α	IL-1 α
• Interleukin 1 β	IL-1 β
• Interleukin 1-Rezeptor-Antagonist	IL-1RA
• Interleukin 2	IL-2
• Interleukin 4	IL-4
• Interleukin 5	IL-5
• Interleukin 6	IL-6
• Interleukin 10	IL-10
• Interleukin 13	IL-13
• Lipopolysaccharide	LPS
• Major-Histo-Kompatibilitäts-Komplex I / II	MHC-I /-II
• Natürlich Killer-Zellen	NK
• Peroxidase	PO
• T-Helferzelle Typ 1	TH ₁ -Zelle
• T-Helferzelle Typ 2	TH ₂ -Zelle
• T-cell-growth-factor β	TGF- β
• Tumor-Nekrose-Faktor- α	TNF α

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wellensiek danke ich für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die Übernahme des Referates.

Herrn Prof. Dr. Hoffmann danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Oschmann danke ich für das ständige Interesse und die Unterstützung bei klinischen Fragestellungen.

Lebenslauf**Persönliche Daten:**

Name: Astrid Monika Jung
 Geburtsdatum: 31.3.1969
 Geburtsort: Geislingen / Steige
 Eltern: Helmut Jung, Diplomingenieur
 Agatha Jung, Angestellte
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung:

1975 - 1988 Schulbesuch in Gießen: Abschluß Abitur, Note 1,9

Studium:

1988 - 1994 Studium der Humanmedizin an der Universität Gießen

Ärztliche Prüfungen:

August 1990 Physikum
 August 1991 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 März 1993 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 Mai 1995 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote: gut

Famulaturen:

1992 Februar - April Unfallchirurgie, Kempten im Allgäu
 1992 Juli / August Neurologie, Universität Gießen
 1993 Februar Gynäkologie und Geburtshilfe, Northeim
 1993 März Kinderheilkundliche Praxis, Gießen
 1993 Juli Kinderheilkunde, Traunstein

Zusätzliche Praktika:

SS 1992 Kursus der klinischen Elektrokardiographie bei PD Dr. Strödter
 SS 1990 Gehörsystem-Seminar bei Prof. Dr. Fleischer
 WS 1992 / 93 Sprachkurs medizinisches Englisch, Universität Gießen

Tätigkeit als studentische Hilfskraft:

SS 1990 Hilfsassistentin im Histologiekurs
 WS 1990/91 Assistenz im Anatomiekurs
 und WS 1991/92
 SS 1992 - WS 93/94 Assistenz im Biochemie-Praktikum und
 Leitung eines Biochemie-Tutoriums für Medizinstudenten

Praktisches Jahr:

Mai - August 1994 Chirurgie, Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld
 August - Dezember 1994 Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Bad Hersfeld
 Dezember 1994 - März 1995 Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Universität Gießen

Berufliche Tätigkeit:

11.9.1995 - 28.2.1997 Beschäftigung als Ärztin im Praktikum im Klinikum Darmstadt
 seit 1.5.1997 Assistenzärztin im Klinikum Schwerin

Fortbildungen:

März 1996 Grundkurs für Sonographie in Mainz
 März 1996 / November 1996 Grundkurs / Aufbaukurs für Allergologie in Mainz
 November 1996 Onkologie in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde in Jena
 Januar 1997 Kurs für endonasale Nasen-Nebenhöhlen-Chirurgien in Fulda
 Februar 1997 Aufbaukurs für Sonographie in Kiel

