

Borrelia burgdorferi

VlsE – ein Meilenstein der Diagnostik?

Borrelieninfektionen stellen nach wie vor eine große Herausforderung für die Labordiagnostik dar. In der Frühphase der Infektionen sind Antikörper häufig nicht nachweisbar. Andererseits sind bei Personen aus Endemiegebieten nicht selten spezifische Antikörper gegen Borrelien nachweisbar, ohne dass eine akute Infektion mit entsprechenden klinischen Symptomen vorliegt. Aus diesen Gründen kann momentan die serologische Labordiagnostik nur unterstützend zur Befundung beitragen. Der Befund einer Lyme-Borreliose ist letztendlich immer klinisch zu erstellen.

Wegen dieser Problematik sind Forscher weltweit auf der Suche nach neuen Markern für eine Verbesserung der Diagnostik. Ein in den letzten Jahren sehr stark diskutierter Marker ist das VlsE (variable major protein-like sequence, expressed). Hierbei handelt es sich um einen rekombinant hergestellten Teil eines Oberflächenproteins von *Borrelia burgdorferi*. Der nach Außen weisende Teil des nativen Proteins ist hoch variabel. Er ändert sich ständig und wird von den Borrelien benutzt, um sich dem Immunsystem des Wirtes zu entziehen. Ein solches Protein ist zunächst für eine Diagnostik, die auf konservierten, bei möglichst vielen Borrelien identisch vorhandenen Antigenen beruht, uninteressant.

Dann hat man aber festgestellt, dass der Teil, mit dem das Protein in der Membran verankert ist, sehr konserviert ist. Nach Außen hin wird der konservierte Bereich von den variablen Bereichen überlagert und so dem Zugriff des Immunsystems entzogen. Erst nachdem antigenpräsentierende Zellen im Verlauf der Immunantwort Borrelien abgebaut und die konservierten Bereiche des VlsE an ihrer Oberfläche

präsentiert haben, ist es dem Immunsystem möglich, hiergegen Antikörper zu bilden.

Dies würde theoretisch aber bedeuten, dass das VlsE für die Diagnostik in der frühen Phase der Immunantwort keinen Beitrag zur Verbesserung der Sensitivität eines Screening-ELISA leistet. Im Gegenteil: Ein ELISA, der nur auf VlsE basiert, sollte weniger sensitiv sein, da für die Diagnostik wichtige andere Antigene fehlen. In der Spätphase der Immunantwort wiederum werden in einem ELISA auf Vollantigen-Basis so viele verschiedene Antikörper erkannt, dass zusätzliches, rekombinant hergestelltes VlsE in der Plattenbeschichtung keinen Effekt haben sollte.

Aus diesem Grund haben wir in einer internen Studie den RIDASCREEN® *Borrelia* IgG EIA (Vollantigen PKo-Stamm) mit zwei kommerziell erhältlichen IgG-ELISA verglichen. Der eine ELISA basierte auf Vollantigen mit zusätzlich rekombinantem VlsE. Bei dem anderen ELISA waren die Platten nur mit VlsE beschichtet. Den Gebrauchsinformationen war nicht zu entnehmen, von welcher Spezies das Antigen stammte. Untersucht wurden 80 Serumproben. Die meisten dieser Proben waren mit der Fragestellung „Borreliose“ an Laboratorien eingeschickt worden. Nach Abschluss der Diagnostik haben uns die Laboratorien die Proben freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Ergänzt wurden die Proben um eine Anzahl von Blutspendeseren.

Jedes Serum, das in einem der ELISA positiv reagierte, wurde mittels Westernblot abgeklärt. Zum Einsatz kamen ein Blot auf der Basis von Vollantigen (PKo-Stamm) und ein Blot mit rekombinantem Antigen. Als eindeutig positiv wurde ein Serum eingestuft, wenn es in beiden Blots positiv bewertet wurde. Nach Westernblot-Analyse waren 32 der 80 Seren eindeutig IgG-positiv. Positive ELISA-Ergebnisse, die im Westernblot nicht eindeutig bestätigt wurden, gab es bei vier Seren.

IgG-positive Seren	RIDASCREEN® (Vollantigen)	ELISA A (Vollantigen + VlsE)	ELISA B (VlsE)
Serum 1	positiv	negativ	positiv
Serum 2	positiv	negativ	negativ
Serum 3	positiv	negativ	negativ
Serum 4	positiv	positiv	negativ
Serum 5	positiv	positiv	negativ
Serum 6	positiv	negativ	negativ
Serum 7-32	positiv	positiv	positiv

Von den 32 eindeutig positiven Seren waren nur 26 in allen drei ELISA positiv. Es gab kein Serum, das in einem der VlsE-Tests positiv und im RIDASCREEN® EIA negativ reagierte. Fünf der sechs diskrepanten Seren waren zudem im IgM-Nachweis positiv (ELISA + WB). Diese Seren zeigten im IgG-Blot eine geringere Bandenzahl, was auf eine frühe Phase der Immunantwort hindeutet.

Die Ergebnisse zeigen, dass in einem ELISA die Verwendung von VlsE nicht zwangsläufig zu einer Verbesserung der Sensitivität führt. Für einen Screening-

Test ist es wichtig, eine möglichst große Vielfalt an frühen Epitopen zu enthalten. Hierdurch ist die für das Screening notwendige Sensitivität gewährleistet. Darüber hinaus ist für die Qualität eines ELISA die Abstimmung des Gesamtsystems entscheidend (Auswahl des Antigens, Qualität der Plattenbeschichtung, spezifische Aktivität des Konjugates, Cut off-Einstellung). Ist diese richtig gewählt, spielt unter einer Vielzahl von Antigenen ein Protein mehr, das zudem in der Immunantwort erst relativ spät zum tragen kommt, keine entscheidende Rolle.

RIDASCREEN® Norovirus ELISA geht ins dritte Jahr!

Unsere nun mehr als zwei-jährige intensive Auseinandersetzung mit der Norovirus-Diagnostik und die dadurch erworbene Erfahrung seit der Neueinführung des RIDASCREEN® Norovirus ELISA im Februar 2003, hat zu einem besseren Verständnis der Diagnostik dieses Erregers geführt. Seit April 2004 ist der RIDASCREEN® Norovirus ELISA der zweiten Generation von R-Biopharm erfolgreich im Markt platziert.

Auch ist das Bewusstsein für diesen meldepflichtigen Erreger im Winter 2004/05, durch die Zahl der übermittelten Infekte Mitte Dezember 2004 laut dem Robert-Koch-Institut (RKI) stark angestiegen.

Diese Häufung beruht auf eine neu zirkulierende Virusvariante innerhalb der Genogruppe II namens Jam(boore)-II/4. Diese wurde erstmals im Sommer 2004 in den Niederlanden nachgewiesen und zunächst nicht weiter verfolgt.

Norovirus-Infektionen – erste Berichte von Todesfällen in Japan!

Aber nicht nur hier in Deutschland oder in Europa, sondern vor allem auch in Japan sind Norovirus-Infektionen ins öffentliche Interesse gerückt. Die „Japan Times“ berichtete am 28. Dezember 2004 erstmals von mehreren Todesfällen, die auf eine Infektion mit diesem Erreger zurückzuführen waren. In insgesamt acht Fällen mehrerer Ausbrüche in verschiedenen Altenpflegeheimen in Hokkaido, Fukujama, Hiroshima (7 Todesfälle) und in Kanagawa (1 Todesfall) kamen Bewohner dieser Altenpflegeheime ums Leben.

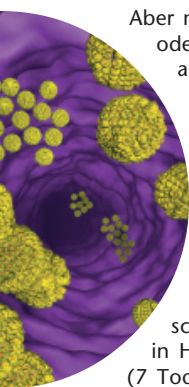
Das zeigt wie ernst eine Infektion mit diesem Erreger sein kann! Nicht umsonst weist das RKI intensiv darauf hin, das beim ersten Hinweis auf eine Norovirus-Infektion – **ohne mikrobiologische Ergebnisse abzuwarten** – Maßnahmen zur Verhütung weiterer Infektionen einzuleiten sind.

Die zu ergreifenden präventive Hygienemaßnahmen:

- Isolierung der Patienten (mit eigenem WC) wobei sie und ihr Besuch in die Händedesinfektion mit einem viruswirksamen Antiseptikum unterwiesen werden müssen
- Bei der Pflege und Betreuung der Patienten sind Einweghandschuhe und Schutzkittel zu tragen

- Tägliche Reinigung mit Desinfektionsmittel von Oberflächen inklusive Türgriffen, mit denen Patienten in Berührung kommen
- Desinfektion und Beseitigung von Erbrochenem und kontaminierten Sachen nur mit angelegten Mund-Nasen-Schutz
- Transport von Bett- und Leibwäsche nur in einem geschlossenen Sack
- Die Wäsche mit einer Temperatur von mehr als 60°C waschen

Für weitere Informationen und bei Fragen bezüglich der Norovirus-Diagnostik steht Ihnen unser Projektmanager Herr Dr. Georgios Kiourkenidis unter folgender Telefonnummer sehr gerne zur Verfügung (06151) 8102-96 oder Sie nehmen per E-Mail (g.kiourkenidis@r-biopharm.de) Kontakt auf.



Anmerkungen zum besseren Verständnis der VTEC/ EHEC-Diagnostik in Stuhl

Spätestens seit Inkrafttreten des neuen Infektionsschutzgesetzes im Jahre 1999, in dem EHEC-Infektionen als meldepflichtige Infektionskrankheiten eingestuft wurden, hat die EHEC-Routinediagnostik eine besondere Bedeutung erlangt. Im Routinelabor findet das Screening der Verotoxin-verdächtigen Stuhlproben statt, d.h. hier wird die Ja / Nein-Aussage getroffen, die darüber entscheidet, welche therapeutischen Maßnahmen am Patienten eingeleitet werden, und ob der weitere Untersuchungsang der Probe fortgesetzt wird.

Die höchste Priorität für den ELISA als Screeningverfahren muß also die maximale Sensitivität sein, d.h. die Vermeidung falsch-negativer Ergebnisse. Für die Sensitivität ist der Anreicherungsprozess der Probe entscheidend. Durch die Art des Mediums und durch die Anreicherungsbedingungen wird die ins Medium exprimierte Menge des Verotoxins entscheidend beeinflusst. Die optimale Induktion der Toxinbildung ist für die Sensitivitätssteigerung unerlässlich, führt andererseits aber auch zu einer Steigerung der Abtötungsrate vermehrungsfähiger VTEC/EHEC-Bakterien in der Mitomycin C-haltigen Anreicherungsbouillon. Denn die Freisetzung von Verotoxin geht immer einher mit der Lyse der induzierten Bakterienzellen.

Bedenkt man ferner, dass in einer zu untersuchenden Stuhlprobe die anzureichernden VTEC/EHEC-Bakterien in einem Verhältnis zu der sonstigen coliformen Flora von 1:200-300 vorliegen, dann wird sehr schnell klar, dass mit der Anreicherung bei gleichzeitiger durch die Toxin-freisetzung bedingten Lysis der Zellen der Anteil der gesuchten und noch vermehrungsfähigen Erreger drastisch abnimmt und dadurch für weitere Kultivierungsverfahren letztendlich verloren sein kann.

Dies führt in der Praxis dazu, dass ein richtig positives Verotoxinergebnis im ersten ELISA-Screening in der Folge keine Bestätigung findet beim Versuch einer erneuten Erregeranreicherung aus dem Sediment der Erstanreicherung, sei es in TSB für eine erneute ELISA-Testung oder auf Enterohämolyysinagar für eine anschließende PCR-Bestimmung. Allzu zu voreilig spricht man dann von einem falsch-positiven ELISA-Ergebnis ohne an die zugrunde liegende Biologie der Erreger und die Bedingungen unter denen Verotoxinbildung stattfindet, zu denken.

Auf die möglichen technischen Fehler bei der ELISA-Durchführung, die überwiegend zu echt falsch-positiven ELISA-Ergebnissen führen, soll an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden, zumal diese nach einem gründlichen Troubleshooting in den meisten Labors komplett vermeidbar werden. Ein ausführlicher Troubleshooting-Guide kann bei R-Biopharm angefordert oder auf der Homepage eingesehen werden.

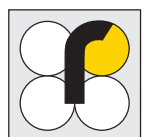
In nur ganz wenigen Ausnahmefällen ist die Spezifität („unspezifische Klebrigkeit“ der eingesetzten Probe) der im ELISA verwendeten Antikörper Ursache für falsch-positive Resultate. Die Hauptursache liegt in der bereits angesprochenen Biologie der Erreger. Angefangen von den gewählten Anreicherungsbedingungen über die Transportbedingungen (Dauer, Temperatur), unter denen die Keime aus dem Sediment der Anreicherungskultur zur Bestätigung versendet werden, bis hin zu den verwendeten Transportmedien, deren Konsistenz mit beeinflusst, wie viel Keime bei der Entnahme des Tupfers im Medium abgestreift werden und somit für die nachfolgend angestrebte Weitervermehrung verloren sind.

Wie stark dieser Verlust an vermehrungsfähigen VTEC/EHEC-Bakterien von einer Anreicherungsphase zur nächsten ist, konnte eindrucksvoll im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Dessau gezeigt werden (Daten unveröffentlicht).

Dort wurde in einer in house-Simulation, d.h. zusätzliche Transportwege und damit verbundene Transporttemperaturen waren dabei ausgeklammert, gezeigt, dass der Anteil vermehrungsfähiger und zur weiteren Verotoxinbildung befähigter Keime nach einer Erstanreicherung in mTSB mit Mitomycin C (Primärkultur) bei einer erneuten Überimpfung ins gleiche Medium und Anreicherung für 18 h um 13 % und bei Überimpfung auf Enterohämolyysin-Agar und Bebrütung für 18 h gar schon um 23 % abnahm. Wurde die gleiche Primärkultur als Sedimenttupfer aus einem Transportmedium auf derartige Weise überimpft, so wie es der vom Referenzzentrum des Robert Koch-Institutes (RKI) vorgeschlagene offizielle Stufenplan für den Versand positiv vorgescrönter Proben vorsieht, und dann nach erneuter Kultivierung für 18 h in mTSB mit Mitomycin C bzw. auf Enterohämolyysinagar im ELISA und in der PCR getestet, lag der Verlust von Verotoxin-bildenden Keimen im ELISA bei 22 % und in der PCR gar bei 48 %.

Damit konnte also klar gezeigt werden, daß es bei einem erheblichen Anteil der Stühle durch die zwischengeschalteten Passagen (Anreicherungskultur, Transportmedium, Enterohämolyysinplatte) zu einer veränderten biologischen Situation im Material kommen kann und die nachgeschaltete PCR aber auch der ELISA dadurch in der Folge negativ ausfallen können, obwohl der Originalbefund aus der Erstanreicherung richtig positiv ist.

In einem von der R-Biopharm AG angelegten Feldversuch mit den beiden Insti-



Tab. 1: Übereinstimmung von Screening-ELISA zum Verotoxinnachweis

	RIDASCREEN	Premier	Prospect
Untersuchte Proben	112	89	101
davon falsch positiv	7	7	5
davon falsch negativ	1	0	3
Abweichung (%)	7,1	7,9	7,8

Als falsch-positiv bzw. falsch negativ galt ein ELISA, wenn er allein diskrepant zu den anderen ELISA-Ergebnissen (Darmstadt, Wernigerode, Dessau) war und/oder zu der Bestätigung mittels PCR (Wernigerode, Dessau)

tuten und bundesweit verteilten Routine-labors sollte diese Labor-Simulation auf ihre Aussagekraft überprüft werden.

Hierzu wurden routinemässig in den Labors im ELISA vorgescreeente Proben als Sedimenttupfer ins RKI zur Bestätigung gesandt und von dort nach Bearbeitung weiter ins BfR. Parallel dazu wurde eine Original-Stuhlprobe zur R-Biopharm AG gesandt, um dort mittels dreier kommerzieller ELISA überprüft zu werden.

Insgesamt verlief dieser Feldversuch etwas enttäuschend, da von insgesamt 117 ins RKI gesandten Proben nur 81 weiter ins BfR geleitet wurden. Von den Stuhlproben direkt kamen andererseits auch nur 91 in der R-biopharm AG an.

Nur 58 Proben erreichten dabei alle drei Bestätigungsstellen.

Davon hatten 39 einen ELISA-Wert von > 0,5 im Primärscreening, die restlichen 19 lagen zum Teil deutlich darunter (5 x unter 0,2).

Im RKI bestätigten sich von den 39 Proben 28 in der PCR (- 28 %) und 30 (- 23 %) im ELISA, im BfR bestätigten sich 22 in der PCR (- 44 %) und nur noch 20 (- 49 %) im ELISA, in der R-Biopharm waren noch 24 (- 38 %) im ELISA positiv.

Im Feldversuch bestätigten sich also die Simulationsergebnisse des BfR in verstärktem Maße, da erwartungsgemäss zusätzlich noch Transport- und Lagerbedingungen die Vermehrungs- und Toxinbildungsfähigkeit negativ beeinflussten.

Ob ein Stuhltupfer direkt gegenüber einem Sedimenttupfer, nach Anreicherung im Transportmedium versendet, Vorteile hinsichtlich der Überlebensfähigkeit der Keime hat, wurde an 21 Proben separat mitgetestet. Hierbei zeigte sich tendenziell ein leichter Vorteil für den

Stuhltupfer sowohl für die PCR als auch den ELISA. Dies bestätigt, dass die Keime durchaus während der Erstanreicherung eine Beeinträchtigung ihrer weiteren Vermehrungsfähigkeit erfahren. Die Untersuchungszahl von 21 getesteten Proben ist jedoch zu klein, um dieses Ergebnis als signifikant zu bewerten.

Ein für die normale Routine jedoch weit-aus interessanterer und für das ELISA-Screening wichtigerer Aspekt war es, zu sehen, inwieweit einer der drei kommerziellen ELISA allein stehend ein abweichendes Ergebnis zu den beiden anderen ELISA und / oder zu den Bestätigungsstellen im RKI und BfR (PCR und ELISA wurden durchgeführt) im Nachweis von Verotoxin zeigte. Diese Ergebnisse sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die kommerziellen ELISA auf einer Augenhöhe liegen und die damit erzielten Ergebnisse im Rahmen der zu erwartenden Sensitivität und Spezifität zuverlässige Ergebnisse liefern, wenn sie sorgfältig durchgeführt und die Anweisungen in den Anleitungen genau beachtet werden. Die gelegentlich geäusserten Aussagen zu falsch-positiven ELISA-Ergebnissen sind bei genauer Betrachtung und Analyse grundsätzlich nicht haltbar und in nur ganz wenigen Ausnahmefällen berechtigt.

Denn ein in der PCR nichtbestätigtes primäres ELISA-Ergebnis ist kein Defizit der ELISA-Spezifität, sondern liegt einerseits im wesentlichen in der Biologie der Erreger begründet, und andererseits wohl auch noch zu einem minimalen Teil im Versagen der sich anschließenden Bestätigungsmethoden.

Insofern kann der ELISA als geeignete effiziente und verlässliche Methode zum Nachweis von Verotoxin in Stuhlproben bezeichnet werden.

R-Biopharm^{news} herausgegeben von

R-Biopharm AG
Landwehrstraße 54, 64293 Darmstadt
Telefon: (0 61 51) 81 02 - 0
Telefax: (0 61 51) 81 02 - 40

