

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Materialverzeichnis**

#### **2.1.1. Technische Geräte**

Brutschrank (Heraeus, Hanau)

Fluoreszenzmikroskop mit einer Wellenlänge von 390 - 420 nm (Zeiss, Jena)

Vortex Mixer Reax 2000 (Heidolph, Schwabach)

Platform Rocker - Schüttler (Heidolph, Schwabach)

Pipet Boy (TecNoMara, Fernwald)

#### **2.1.2. Kleingeräte**

Sterile Mikro-Schraubröhren 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht)

Mikropipette 0,5 - 10 µl (Eppendorf, Hamburg)

Mikropipette 2 - 20 µl (Eppendorf, Hamburg)

Mikropipette 20 - 200 µl (Eppendorf, Hamburg)

Mikropipette 200 - 1000 µl (Eppendorf, Hamburg)

Entsprechende Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg)

Inkubationswannen (Genzyme Virotech, Rüsselsheim)

Pinzette (J.Söllner GmbH, Deggendorf)

#### **2.1.3. Chemikalien**

PBS Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Biochrom, Berlin)

Aqua tridestillata

#### **2.1.4. Industriell gefertigte Testkits für den Nachweis von IgG- oder IgM-Antikörpern gegen *A. phagocytophilum***

##### **2.1.4.1. HGA IgG und IgM Immunfluoreszenztest (IFT)**

(Hersteller: MRL Diagnostics, USA; Vertrieb: Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim)

##### **Definition:**

Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörpertest für den Nachweis von IgG- bzw. IgM-Antikörpern gegen *A. phagocytophilum*.

### **Testprinzipien:**

Sowohl der IgG IFT als auch der IgM IFT benutzen mit *A. phagocytophilum* infizierte HL-60-Zellen, die nach Inaktivierung der Bakterien auf Objektträgern fixiert werden. Der Test läuft in 2 Phasen ab („Sandwich“-Durchführung).

Phase 1: Reaktion von humanen IgG- bzw. IgM-Antikörpern mit HGA-infizierten HL-60 Zellen.

Phase 2: Reaktion von Fluoreszein-markierten Antikörpern gegen humane IgG- bzw. IgM-Antikörper.

Beim IgM IFT müssen vor der Testdurchführung die IgG-Antikörper aus den zu untersuchenden Seren entfernt werden. IgG-Antikörper könnten mit den IgM-Antikörpern konkurrieren und falsch-negative Ergebnisse verursachen; durch komplexiertes IgG wären außerdem falsch-positive Ergebnisse möglich. Daher werden die Seren beim IgM IFT mit einem monospezifischen Antiserum gegen humanes IgG von der Ziege verdünnt, um freie und komplezierte IgG-Antikörper zu entfernen (Tab. 6).

### **Sensitivität und Spezifität des HGA IgG IFT:**

Sensitivität: Der Hersteller hat zur Beurteilung der Sensitivität des IgG IFT 30 Seren von 15 Patienten getestet, die eine durch Anamnese, Klinik, Giemsa-Färbung mit Morulae-Nachweis und PCR bestätigte HGA aufwiesen. Hierbei wurden Proben untersucht, die sowohl innerhalb von 60 Tagen nach Beginn der Symptome als auch über diesen Zeitraum hinaus entnommen wurden. Der IgG IFT erkannte 100% der im Zeitraum von 60 Tagen nach Symptombeginn entnommenen Seren als positiv. Für die nach über 60 Tagen nach Symptombeginn entnommenen Seren hatte der IgG IFT eine Sensitivität von 76,9%.

Spezifität: Eine Gesamtzahl von 85 Seren von Blutspendern wurde mit dem IgG IFT untersucht; 25 Seren stammten aus Slowenien, einem Endemiegebiet der HGA, 20 aus Frankreich und 40 aus Kalifornien. Der Test erkannte alle 85 Seren als negativ für Antikörper gegen *A. phagocytophilum* und hatte damit für diese 85 Seren eine Spezifität von 100%.

### **Sensitivität und Spezifität des HGA IgM IFT:**

Sensitivität: Vom Hersteller wurden 30 Seren von 15 Patienten getestet, die eine durch Anamnese, Klinik, Giemsa-Färbung mit Morulae-Nachweis und PCR bestätigte HGA aufwiesen. 14 Seren wurden innerhalb des Zeitraums von 60 Tagen nach Symptombeginn entnommen, 13 Seren später als 60 Tage nach Symptombeginn und 3 Seren waren zu einem

unbekannten Zeitpunkt entnommen worden. Der IgM IFT erkannte 71,4% der innerhalb von 60 Tagen nach Symptomeinsetzen entnommenen Seren als positiv. Von den später als 60 Tagen nach Symptombeginn entnommenen Seren wurden 7,7% positiv getestet. Von den zu einem unbekanntem Zeitpunkt entnommenen Seren wiesen 100% IgM-Antikörper auf.

Spezifität: Eine Gesamtzahl von 85 Seren von Blutspendern wurde mit dem IgM IFT untersucht; 25 Seren stammten aus Slowenien, einem Endemiegebiet der HGA, 20 aus Frankreich und 40 aus Kalifornien. Der Test erkannte 100% der slowenischen Seren und der europäischen Seren als negativ; für die amerikanischen Seren wies der Test eine Spezifität von 97,5% auf.

**Bestandteile der Testkits:**

- HGA IFT IgG bzw. IgM Objektträger (beschichtet mit inaktivierten HGA-Antigenen)
- IgG- bzw. IgM-Konjugat (2,5 ml): Affinitätsgereinigte Fluoreszein-markierte anti-humane-IgG- bzw. IgM-Antikörper von der Ziege
- IgG- bzw. IgM-positive Kontrolle (0,3 ml)
- Negativkontrolle (0,25 ml)
- Einbettungsmedium (2,5 ml): PBS-gepuffertes Glycerol mit einem pH-Wert von  $7,2 \pm 0,1$  und 0,05% Methiolat
- PBS-Pulver: Mit 1l destilliertem Wasser ergibt sich eine 0,01M Pufferlösung mit einem pH-Wert von  $7,2 \pm 0,1$
- IgM-Verdünnungspuffer (12 ml): monospezifisches Antiserum gegen humanes IgG von der Ziege in PBS (nur IgM IFT)

Tab. 6: Ablauf des IFT

HGA IFT	IgG	IgM
<b>Vorbereitung</b>		
Temperaturangleichung	Objektträger auf Raumtemperatur bringen.	
Verdünnung	Zu untersuchende Seren in eine Verdünnung von 1 : 64 mit PBS bringen.	5 µl des zu untersuchenden Serums mit 95 µl IgM-Verdünnungspuffer mischen, es entsteht eine Serumverdünnung von 1 : 20.
<b>Durchführung</b>		
Proben auf Objektträger auftragen	Jeweils 25 µl des verdünnten zu untersuchenden Serums bzw. der Positiv- oder Negativkontrolle auf die Auftragsfelder der Objektträger pipettieren.	

Inkubation 1	30±2 Minuten bei 37°C in einer Feuchtigkeitskammer.	90±2 Minuten bei 37°C in einer Feuchtigkeitskammer.
Waschen 1	Objektträger jeweils 1× mit PBS und deionisiertem Wasser abspülen.	
Trocknen 1	Objektträger an der Luft trocknen lassen.	
Fluoreszein-markierte Anti-human-IgG- bzw. IgM-Antikörper auftragen	Auf jedes Auftragsfeld der Objektträger 25 µl IgG- bzw. IgM-Konjugat pipettieren.	
Inkubation 2	30±2 Minuten bei 37°C in einer Feuchtigkeitskammer.	90±2 Minuten bei 37°C in einer Feuchtigkeitskammer.
Waschen 2	Objektträger jeweils 1× mit PBS und deionisiertem Wasser abspülen.	
Trocknen 2	Objektträger an der Luft trocknen lassen.	
<b>Auswertung</b>		
Einbettung	Mit Einbettungsmedium und Deckgläschen die Objektträger fixieren.	
Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	Bei einer mindestens 630-fachen Vergrößerung.	

#### 2.1.4.2. HGA IgG Western Blot

(Hersteller: MarDx Diagnostics, Inc., Carlsbad, CA, USA; Vertrieb: Trinity Biotech, Bray, County Wicklow, Ireland)

##### **Definition:**

Western Blot für den Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *A. phagocytophilum*.

##### **Testprinzip:**

Der MarDx/Trinity Biotech Western Blot verwendet gereinigte Antigene des Bakteriums *A. phagocytophilum*, kultiviert aus einem Patienten aus New York. Als spezifische Oberflächen-Antigene werden 42 kD und 44 kD schwere Proteine verwendet. Die Antigene werden fraktioniert und auf Nitrozellulosemembran gebracht. Serumantikörper gegen *A. phagocytophilum* binden an die gereinigten HGA-Antigene auf den Teststreifen und werden dann durch einen weiteren Antikörper gegen humanes IgG sichtbar gemacht (Tab. 7).

##### **Sensitivität und Spezifität des Tests:**

Sensitivität: Vom Hersteller wurden zur Beurteilung der Sensitivität dieser Testmethode 83 durch klinische Befunde und positive IFT-Ergebnisse belegte HGA-positive Patientenserum untersucht. Im IgG Western Blot wurden 81 von 83 dieser Seren positiv getestet. Dies entspricht einer Sensitivität von 97,6%.

Spezifität: Von einer Gesamtzahl von 255 HGA-negativen Seren wurden 241 Proben negativ im Western Blot getestet. Damit hatte der Test für diese Stichprobe eine Spezifität von 96,4%. Unter den negativen Seren befanden sich 85 Proben von gesunden Blutspendern, 60 Borreliose-positive Seren und 25 Lues-positive Seren.

**Bestandteile des Testkits:**

- 20 Nitrozellulosestreifen beschichtet mit gereinigten HGA-Antigenen
- Waschlösung (100 ml)
- Waschpuder (5g)
- Positivkontrolle (250 µl)
- schwach-reaktive Positivkontrolle (100 µl)
- Negativkontrolle (100 µl)
- Antikörper-Konjugat (4,5 ml): IgG-Antikörper gegen humanes IgG
- Farbentwicklungslösung (45 ml)

Tab. 7: Ablauf des Western Blot

<b>Vorbereitung</b>	
Temperaturangleichung	Alle Bestandteile des Testkits auf Raumtemperatur bringen.
Waschlösung herstellen	100 ml der Waschlösung (10-fach Konzentrat) werden mit 900 ml deionisiertem Wasser gemischt.
Antikörperkonjugat verdünnen	Das Antikörperkonjugat wird in einem Verhältnis von 1 zu 9 mit der hergestellten Waschlösung verdünnt.
<b>Durchführung</b>	
Streifen vorbereiten	Mit einer Pinzette je einen Streifen in einen Kanal der Inkubationswanne bringen und mit 2 ml Waschlösung versetzen.
Inkubation 1	5 Min. auf dem Schüttler einwirken lassen.
Hinzufügen der Kontrollen und Serumproben	80 µl der Positivkontrolle und 20 µl der schwach-reaktiven Positivkontrolle, der Negativkontrolle und der zu untersuchenden Seren in die jeweiligen Kanäle der Inkubationswanne geben.
Inkubation 2	60 Min. auf dem Schüttler inkubieren.
Waschen 1	Proben abgießen, 2 ml Waschlösung in jeden Kanal geben, 5 Min. einwirken lassen. Diesen Vorgang 2× wiederholen.
Antikörper-Konjugat	2 ml des hergestellten Antikörper-Konjugats in jeden Kanal geben.
Inkubation 3	15 Min. auf dem Schüttler inkubieren.
Waschen 2	Proben abgießen, 2 ml Waschlösung in jeden Kanal geben, 5 Min. einwirken

	lassen. Diesen Vorgang 2× wiederholen. Abschließend mit 2 ml deionisiertem Wasser waschen.
Farbentwicklung	2 ml Farbentwicklungslösung in jeden Kanal geben.
Inkubation 4	Nach 4 - 7 Min. entwickeln die positiven Proben eine sichtbare 44 kD-Bande.
Trocknen	An der Luft werden die Streifen getrocknet.
<b>Auswertung</b>	
Ablesen	Die Streifen sind ein permanenter Nachweis der Ergebnisse, die Farbe bleibt bestehen. Durch Ausmessen kann ermittelt werden, ob tatsächlich die 44 kD-Bande positiv gewertet werden kann.

## 2.2. Auswahl der zu untersuchenden Seren

### 2.2.1. Borreliose-positive Patientenserum

Die HGA und die Lyme-Borreliose werden in Europa durch *Ixodes*-Zecken übertragen, und mit *A. phagocytophilum* und Borrelien infizierte Zecken kommen auch in Deutschland vor (BAUMGARTEN et al., 1999; HILDEBRANDT et al., 2002). Da diese Zecken gleichzeitig beide Infektionserreger (*A. phagocytophilum* und *Borrelia burgdorferi*) in sich tragen können, besteht für den Menschen prinzipiell die Gefahr einer Doppelinfektion (NADELMAN et al., 1997). Patienten mit einem positiven Borrelien-Titer müssen zumindest einen Zeckenstich gehabt haben und waren somit potentiell auch *A. phagocytophilum* exponiert. Um das Vorkommen der HGA in der Region Berlin/Brandenburg zu evaluieren, wurden aus der Serumbank des Instituts für Infektionsmedizin 422 Borreliose-positive Seren, entnommen in den Jahren 1994 bis 2001, von 422 verschiedenen Patienten ausgewählt und auf Antikörper gegen *A. phagocytophilum* untersucht (Tab. 8). Auswahlkriterien für diese Seren waren ein Borreliose-IFT  $\geq 64$  und ein positiver IgG- oder IgM-Nachweis im ELISA.

Tab. 8: Borreliose-positive Patienten: Anzahl der untersuchten Seren

Jahr der Serumentnahme	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	Summe
Anzahl der untersuchten Seren aus dem jeweiligen Jahr	97	62	45	69	43	45	30	31	422

### 2.2.2. Kontrollseren

Als Kontrollgruppen wurden insgesamt 249 Proben, davon 107 Lues-positive und 142 Chlamydien-positive Patientenseren, aus den Jahren 1996 bis 2001, ausgewählt (Tab. 9). Diese Kontrollseren wurden aus folgenden Gründen ausgesucht:

1. Der Erreger der Syphilis ist das Schraubenbakterium *Treponema pallidum*, verwandt mit *B. burgdorferi*. Auswahlkriterien dieser Kontrollseren waren ein TPHA oder TPPA  $\geq 160$  und ein positiver FTA-Abs.
2. Chlamydien sind mit *A. phagocytophilum* verwandt (siehe 1.2.). Es wurden ausschließlich Seren mit einem positiven IgG-Titer ausgewählt.

Tab. 9: Kontrollgruppen: Anzahl der untersuchten Seren

Jahr der Serumentnahme	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Anzahl der untersuchten Lues-positiven Seren aus dem jeweiligen Jahr	20	19	17	20	15	16
Anzahl der untersuchten Chlamydien-positiven Seren aus dem jeweiligen Jahr	25	33	27	26	15	16
Gesamtzahl der Kontrollseren	45	52	44	46	30	32

### 2.2.3. Alters- und Geschlechterverteilung der verschiedenen Patientengruppen

Die Kontrollgruppe mit beiden Untergruppen wurde hinsichtlich Alters- und Geschlechterverteilung den Seren der Borreliose-positiven Patienten angeglichen (Tab. 10). Der Altersdurchschnitt der 422 Borreliose-positiven Patienten betrug 47,2 Jahre, das Spektrum reichte vom 1-jährigen Patienten bis zum 88 Jahre alten Patienten. Da die Altersverteilung der Kontrollgruppen an die der Borreliose-positiven Patienten angeglichen wurde, hatte die Lues-positive Gruppe einen Altersdurchschnitt von 47,8 Jahren, und die Chlamydien-positiven Patienten waren im Durchschnitt 48,8 Jahre alt.

Tab. 10: Altersverteilung der verschiedenen Patientengruppen

	<b>Borreliose – positive Seren</b>	<b>Kontrollgruppen zusammengefaßt</b>	<b>Lues – positive Seren</b>	<b>Chlamydien – positive Seren</b>
<b>Altersdurchschnitt</b>	47,2 Jahre	48,3 Jahre	47,8 Jahre	48,8 Jahre

Die Gruppe der Borreliose-positiven Patienten teilte sich in 222 Männer und 200 Frauen auf, dies entspricht einem Verhältnis Männer : Frauen von 1,1 : 1. Betrachtet man die beiden Kontrollgruppen zusammen, so wiesen diese ein Verhältnis von Männern : Frauen von 1,4 : 1 auf. In der Lues-positiven Patientengruppe waren mehr als doppelt so viele Männer wie Frauen. Das hängt damit zusammen, dass diese Erkrankung insgesamt eine deutlich höhere Inzidenz bei Männern aufweist. Das Robert-Koch-Institut gibt in Deutschland für das Jahr 2001 1679 Lues-Neuerkrankungen an, 79% der Betroffenen waren Männer.

Die Chlamydien-positiven Patientenserum wurden von 69 Männern und 73 Frauen entnommen, das entspricht einem Verhältnis Männer zu Frauen von 1 : 1,1 (Tab. 11).

Tab. 11: Geschlechterverteilung der verschiedenen Patientengruppen

	<b>Borreliose – positive Seren</b>	<b>Kontrollgruppen zusammengefaßt</b>	<b>Lues – positive Seren</b>	<b>Chlamydien – positive Seren</b>
<b>Geschlechterverteilung Männer : Frauen</b>	222 : 200	146 : 103	77 : 30	69 : 73
<b>Verhältnis Männer : Frauen</b>	1,1 : 1	1,4 : 1	2,6 : 1	1 : 1,1

### 2.3. Beurteilung

Zum Nachweis von Antikörpern gegen *A. phagocytophilum* wurden zuerst alle Serumproben mit dem IFT geprüft. Ein Titer von  $\geq 64$  galt laut Herstellerangaben als positiv.

Die Auswertung der Objektträger erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops bei einer Wellenlänge von 390 - 420 nm und mit einer 630-fachen Vergrößerung unabhängig durch zwei Untersucher. Bei Nichtübereinstimmen der Ergebnisse wurde durch nochmaliges Auswerten ein Konsens gebildet oder die Probe erneut im IFT getestet.



Von den im IFT positiven Proben wurde durch die Herstellung einer Verdünnungsreihe der jeweilige Titer bestimmt. Die Auswertung erfolgte wie zuvor unabhängig durch zwei Untersucher.

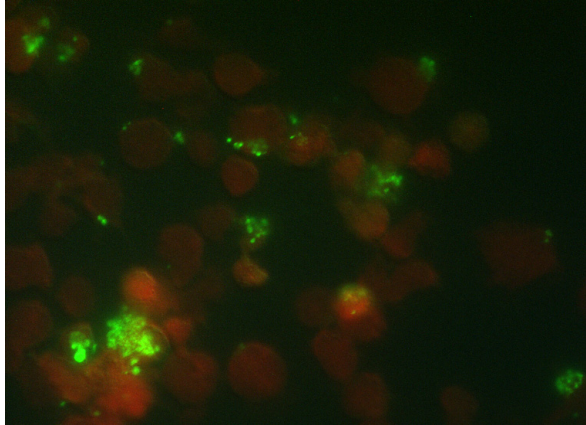


Abb. 3A

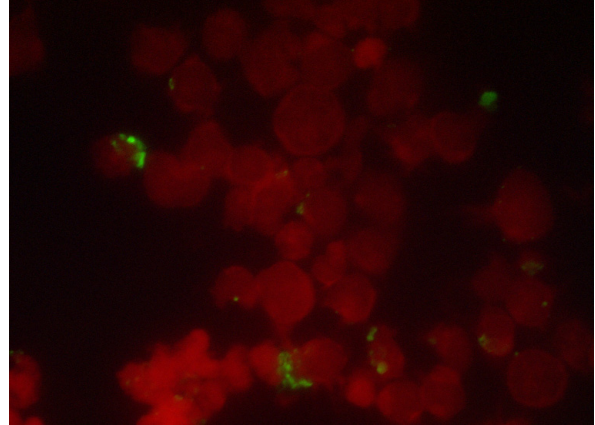


Abb. 3B

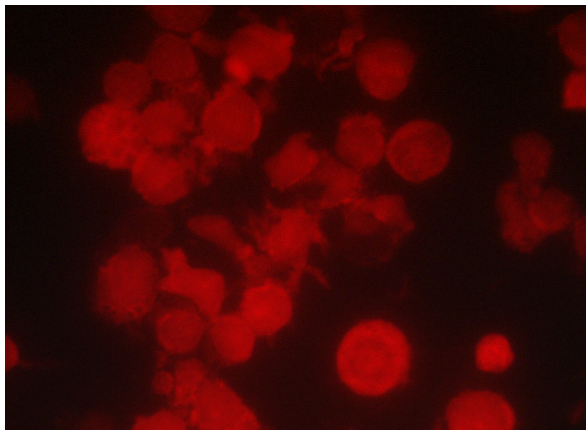


Abb. 3C

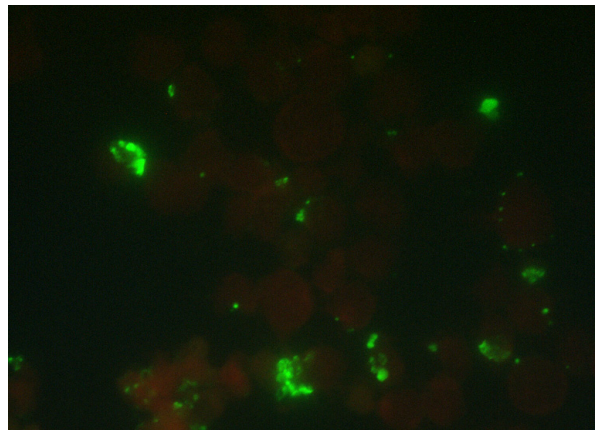


Abb. 3D

Abb. 3: Bewertung des IFT. Auf mit *A. phagocytophilum*-infizierten HL-60-Zellen beschichteten Objektträgern wurden pro Auftragsfeld 25  $\mu$ l der Kontrollen bzw. der verdünnten Serumproben aufgetragen. Die Serumproben wurden 1:64 mit PBS verdünnt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C, Waschen und Trocknen wurden die Auftragsfelder mit je 25  $\mu$ l eines Fluoreszein-markierten Antikörperkonjugates gegen humanes IgG versetzt. Nach erneuter Inkubation bei 37°C, Waschen, Trocknen und Einbetten wurden die Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 630facher Vergrößerung beurteilt. **A** Vom Hersteller mitgeliefertes positives Serum. **B** 1:8-Verdünnung der Positivkontrolle. **C** Vom Hersteller mitgeliefertes Negativserum. **D** Patientenprobe.

Die im IFT positiven Seren mit einem Titer von  $\geq 64$  wurden mit dem Western Blot überprüft. Sobald ein Serum eine mit der schwachen Positivkontrolle vergleichbare Färbung auf dem Nitrozellulosestreifen hervorrief, wurde dieses als positiv gewertet.



Abb. 4A



Abb. 4B

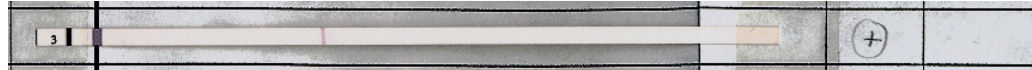


Abb. 4C



Abb. 4D

Abb. 4: Bewertung des IgG Western Blots. Vom Hersteller mit gereinigten *A. phagocytophilum*-Antigenen beschichtete Nitrozellulosestreifen wurden in Inkubationswannen mit 2 ml Verdünnungs-/Waschlösung versetzt und 5 Minuten bei 20°C inkubiert. Anschließend wurden 80 µl der Positivkontrolle bzw. 20 µl der verdünnten Positivkontrolle, der Negativkontrolle oder der Serumproben hinzugefügt und 60 Minuten inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden 2 ml eines Antikörperkonjugates gegen humanes IgG hinzugefügt und 15 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 2 ml einer Farbentwicklungslösung bildete sich nach ca. 5 Minuten bei der Positivkontrolle (A) die Bande bei 44/42 kD. B Negativkontrolle. C und D verdünnte Positivkontrolle bzw. positives Patientenserum mit deutlich erkennbarer Bande bei 44 kD.

#### 2.4. Meteorologische Daten

Alle meteorologischen Daten wurden freundlicherweise vom Institut für Meteorologie der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt.

#### 2.5. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse des IFT wurden mit Hilfe des  $\chi^2$ -Tests auf statistische Signifikanz überprüft. Dabei gilt ein p-Wert von  $> 0,05$  als statistisch nicht signifikant, ein Wert von  $< 0,05$  ist statistisch signifikant und im Falle eines p-Wertes von  $< 0,01$  gilt das Ergebnis als statistisch sehr signifikant.