

Michael Färber

Dr. med

Optimierung eines Multiplex basierten Fluoreszenz-Tests (Luminex-Technologie) zur Diagnose der Lyme Borreliose

Fach/Einrichtung: Immunologie

Doktorvater: Prof. Dr. Reinhard Wallich

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es einen beadbasierten Multiplextest für die Borrelienserologie durch Adaptierung an ein neues Beadsystem (1.), sowie Testung und Etablierung neuer Antigene und Antigenkopplungen zu verbessern (2.) und diese Veränderungen durch Messung definierter Seren zu evaluieren(3.). Zudem sollte ein beadbasierter CXCL13 Antigentest etabliert werden (4.).

Durch die neue Generation von magnetischen Beads die von der Firma Luminex Corp. für die Verwendung von Multiplexassays entwickelt wurde, ergab sich für die IgG und IgM Borrelienbestätigungstests der Firma Diamex GmbH, die zu Beginn der Doktorarbeit noch auf den nicht magnetischen Vorgängern (Serobeads) basierten, die Notwendigkeit der Umstellung. Im Laufe der Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass die Umstellung des Testsystems auf die Magplex® Beads möglich war. Im Einzelnen musste dazu die Kopplungskonzentration der Antigene p100 und p58 um den Faktor 1,3 auf 4,5 bzw. 52ng/µg (Antigen/Beads) erhöht werden.

Durch Verwendung neuer Antigene (p58 Peptide, OspC Varianten, DbpA Varianten) sollte eine Verbesserung der Sensitivität und Spezifität des Tests erreicht werden. Da in Europa 5 relevante Borrelienspezies bekannt sind, im Testsystem allerdings im Fall von OspC maximal 2 Varianten des Proteins, im Fall von DbpA sogar nur eine Variante im Test Verwendung fand, wurde für beide Proteine getestet, ob eine Verwendung aller 5 Varianten die Sensitivität für das jeweilige Protein erhöhen kann. Dabei zeigte sich, dass der Mehrwert der 3 weiteren Varianten OspC *B. bavariensis* PBi, *B. burgdorferi* ZS7 und *B. spielmanii* A14S zusätzlich zu den Varianten OspC *B. afzelii* PKo und *B. garinii* PBr für OspC messbar, allerdings relativ klein war (72% statt 73,5% im IgM Test). Zudem wurde dieser Zugewinn mit einem Verlust bei der Spezifität des Antigens erkauft (90-95,7% statt 100% im IgM Test). Hingegen konnte durch die Verwendung der 4 neuen Varianten DbpA *B. spielmanii* A14S, *B. burgdorferi* B31, *B. bavariensis* PBi, *B. garinii* PBr zusätzlich zu DbpA *B. afzelii* PKo die Sensitivität dieser Proteingruppe deutlich von 45,6% auf 60% % im IgG Test erhöht werden. Die Spezifität des Proteins blieb dabei erfreulicher Weise unverändert hoch bei 100%.

Es zeigte sich allerdings, dass die Gesamtauswertung der Testsysteme durch die Verwendung der verschiedenen Proteinvarianten kaum verbessert werden konnte. Im Fall von DbpA reagierten alle mit neuen DbpA Varianten reagierenden Seren bereits mit einer ausreichend Anzahl von anderen Antigenen des IgG Testsystems wodurch deren Gesamtbewertung ohnehin schon positiv war. Hingegen konnte die Sensitivität des IgM Tests durch die Verwendung der OspC Varianten erhöht werden, dies ging allerdings mit einer nahezu entsprechenden Senkung der Spezifität einher. Für das in der Arbeit verwendete Testpanel ist für die IgM Testung die Testsensitivität von 68,5 auf 70,5% gestiegen, dafür aber die Spezifität von 100 auf 96,4% gesunken. Für die IgG Testung gab es keine Veränderung von Testsensitivität (87%) oder Spezifität (100%). Es ist aber davon auszugehen, dass bei Testung weiterer Seren oder einer anderweitigen Umstellung des Testsystems sich auch die Verwendung der DbpA Varianten als vorteilhaft erweisen wird. Durch eine Kopplung mehrerer Varianten an die selbe Beadregion und das Weglassen von OspA konnte die Testumstellung erreicht

werden ohne die für den Test nötige Anzahl an Beadregionen im IgM Test zu erhöhen (10 Beadregionen), im IgG Test war eine zusätzliche Region nötig (11 Regionen).

Schließlich konnte auch der CXCL13 Antigen test etabliert werden, der eine, kommerziellen Testsystemen (Mikrogen recombead CXCL13) ähnliche, Nachweisgrenze von $\sim 25\text{pg/ml}$ erreicht. Zudem war die quantitative Messung der CXCL13 Konzentrationen im Liquorproben möglich. IgM Titer von akuten, positiven Neuroborreliosen konnten von anderen Verläufen der Borreliose bzw. anderen Erkrankungen mit einer Sensitivität von 50% und einer Spezifität von 100% abgegrenzt werden. Diese neue Form der Liquordiagnostik kann Anwendung finden, um das zeitliche Fenster der Borreliennachweislücke im Liquor zu verkleinern und erlaubt in Kombination mit der Beurteilung von Antikörperindizes eine bessere Korrelation der Klinik mit der Diagnostik.