Open Access

Berl Münch Tierärztl Wochenschr
DOI 10.2376/0005-9366-17029

© 2017 Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:
christine.klaus@fli.de

Eingegangen: 11.04.2017
Angenommen: 10.07.2017

Online first: 24.07.2017
http://vetline.de/open-access/158/3216/

Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen, Jena[1]
Friedrich-Loeffler-Institut, Institut für Virusdiagnostik, Greifswald-Insel Riems[2]

Beitrag zur serologischen Diagnostik der Lyme-Borreliose beim Hund

Contribution to the serodiagnosis of Lyme borreliosis in dogs

Christine Klaus[1], Roland Diller[1], Elke Elisabeth Hasse[1], Donata Hoffmann[2]

Zusammenfassung

Es werden vergleichende Untersuchungen zur serologischen Diagnostik der Antikörpertiter bei Lyme-Borreliose des Hundes dargestellt. Dabei kamen vier verschiedene Testkits zum Einsatz, die sowohl die klassischen zweistufigen Verfahren mit ELISA und Bestätigung der tatsächlich positiven Proben mittels Blot, einen Schnelltest und einen ELISA auf der Basis des C6 Antigens umfassten und an bis zu 561 Hundeseren vergleichend getestet wurden. Es wurde deutlich, dass die erzielten Ergebnisse auch ganz wesentlich vom verwendeten Testkit und dem darin zum Einsatz kommenden Antigen abhängen. Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Interpretation von Laborergebnissen, die immer im Kontext mit Anamnese und klinischer Symptomatik erfolgen sollte.

Schlüsselwörter: *Borrelia burgdorferi*, Hund, ELISA, Westernblot

Summary

These investigations compared serological methods for detection of Lyme borreliosis antibody titres in dog sera. Four different test kits were used, including the classical two-step methods based on ELISA and confirmation of positive samples by blot, as well as a rapid test and an ELISA based on C6 antigen. Up to 561 dog sera were investigated. It was shown that the results were influenced considerably by the selected test kits and the included antigen preparation. The investigations highlight that results in the lab should be interpreted with care and only in connection with anamnesis and clinical findings.

Keywords: *Borrelia burgdorferi*, dog, ELISA, Westernblot

U.S. Copyright Clearance Center Code Statement:
0005-9366/2017/17029 $ 15.00/0

Einleitung

Die Lyme-Borreliose, verursacht durch *Borrelia burgdorferi* sensu lato, ist in Deutschland und darüber hinaus in ganz Europa die mit Abstand bedeutendste durch Zecken übertragene Krankheit beim Menschen. Allein in Deutschland wird die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen auf einige Zehntausend bis 100.000 geschätzt. Objektive Angaben zu den Fallzahlen sind schwierig, da nur in einigen Bundesländern Meldepflicht besteht. Nach statistischen Erhebungen aus den fünf neuen Bundesländern und Berlin in den Jahren 2009 bis 2012 schwankt die Inzidenz zwischen 34,9 Fällen/100.000Einwohner im Jahr 2009 und 19,54 Fällen/100.000 Einwohner im Jahr 2012 (Wilking and Stark, 2014).

Zur Diagnostik der Krankheit beim Menschen werden die Anamnese, das klinische Bild und Laboruntersuchungen herangezogen. Anamnestisch ist von Interesse, ob ein Zeckenstich bemerkt wurde und, da ein Zeckenstich nicht immer erinnerlich ist, ob ein Aufenthalt in einem Zeckenhabitat stattgefunden hat. Klinisch ist das *Erythema migrans*, die sogenannte Wanderröte, pathognomonisch, dies tritt allerdings nicht bei allen Infektionen auf. Als klinische Symptome sind die Lyme-Arthritis, die Neuroborreliose und Hauterkrankungen, wie die *Acrodermatitis chronica* oder das Lymphadenom sowie weitere Organbeteiligungen beschrieben (Hengge et al., 2003), die bei unspezifischerer Symptomatik eine differentialdiagnostische Abklärung erfordern. Als labordiagnostische Methode wird häufig der *Borrelia*-Antikörpertiter herangezogen (direkte Nachweise wie PCR und Anzucht gelingen nur selten) und ein Anstieg innerhalb von vier bis sechs Wochen nach Zeckenstich im

Zusammenhang mit den vorliegenden klinischen Symptomen als stattgehabte *Borrelia*-Infektion interpretiert. Auch Hunde können an einer Lyme-Borreliose erkranken. Einen umfassenden Überblick zur Lyme-Borreliose bei Hunden bezüglich Epidemiologie, Diagnostik, Therapie und Prophylaxe geben Krupka and Straubinger (2010). Aktuell zu dieser Problematik ist außerdem am 12.12.2016 die Leitlinie zur Impfung von Kleintieren in 4. Auflage erschienen, in der auch auf die Borreliose beim Hund eingegangen wird (Friedrich-Loeffler-Institut, 2016). Darüber hinaus scheinen einzelne Rassen, wie z.B. Berner Sennenhunde, besonders für eine Infektion mit Borrelien empfänglich zu sein (Preyß-Jägeler et al., 2016). Experimentelle Infektionen sind insbesondere in den USA durchgeführt worden. Die Tiere zeigten intermittierende Lahmheiten mit geschwollenen Gelenken, Fieber und Anorexie (Littman et al., 2006; Krupka and Straubinger, 2010). Es wird bei <1 bis 2 % der an Lyme-Borreliose erkrankten Hunde auch ein Zusammenhang zu einer Glomerulonephritis vermutet, wobei diese bei experimenteller Infektion bisher nicht nachgewiesen wurde, auch wenn die Erkrankung häufig mit hohen *Borrelia*-Antikörpertitern assoziiert war (Littman, 2013). Bei diesem als Lyme-Nephritis bezeichneten Krankheitsbild handelt es sich um eine infektionsbezogene, sterile, immunmediierte Glomerulonephritis (Pantchev et al., 2015), die möglicherweise in ihrer frühen und milden Form unterdiagnostiziert ist (Littman, 2013) und noch weiterer Untersuchungen bedarf. Einen Zusammenhang zwischen einem Marker (Serum-SDMA), der den Funktionsverlust der Nephrone frühzeitig anzeigt und dem Antikörpertiter eines quantitativen C6-ELISAs konnten Nather et al. (2016) zeigen, was ebenfalls die Beteiligung einer *Borrelia*-Infektion an einer Nierenschädigung nahe legt.

Wie in der Humanmedizin spielt auch beim Hund neben der Klinik die Anamnese und Labordiagnostik eine Rolle zur Diagnosestellung, jedoch ist der Schwerpunkt deutlicher als in der Humanmedizin zur Labordiagnostik verschoben. Der direkte Erregernachweis ist nur von untergeordneter Bedeutung. Die Anzucht ist schwierig und kann nur in Speziallaboren vorgenommen werden. Positive PCR-Resultate sind außerdem mit Vorsicht zu beurteilen, da sie nicht zwischen lebenden und bereits abgestorbenen Borrelien unterscheiden können und somit diese u.U. auch nach erfolgreicher Therapie noch nachgewiesen werden (Hengge et al., 2003). Hinzu kommt, dass Borrelien bindegewebeassoziiert vorliegen, damit die „gängigen" Untersuchungsmaterialien, wie Blutserum oder Harn, ungeeignet sind und außerdem häufig der tierische Patient schon vor der Probennahme mit Antibiotika therapiert wurde, womit die Aussicht auf einen direkten Erregernachweis insgesamt stark reduziert ist.

Deshalb wird analog zur Humanmedizin auf den Nachweis der spezifischen Antikörpertiter zurückgegriffen, wobei unterschiedliche Antigene und Antigenpräparationen zum Einsatz kommen. Da bei ELISAs auf der Antigenbasis von Ganzzell-Lysaten mit einer Reihe von unspezifisch positiven Resultaten zu rechnen ist, sollten ELISA positive Seren mittels Blot als zweistufiges Verfahren verifiziert werden. Darüber hinaus können Ganzzell-basierte Tests in der Veterinärmedizin in der frühen Phase der Infektion einen Sensitivitätsnachteil aufweisen, da sie kein VlsE (Variable major protein (VMP) like sequence Expressed) als frühen Marker einer Infektion enthalten. Die Ursache dieser unspezifisch positiven Reaktionen im ELISA ist auf Kreuzreaktionen zurückzuführen, die durch Antikörper anderer eng verwandter Bakterienspezies verursacht werden. Das sind z.B. Leptospiren, wobei insbesondere konservierte Antigene, wie z.B. Flagellin, diesen Effekt auslösen. Neuere ELISAs auf der Antigenbasis des synthetischen Peptids C6 sollen dagegen so spezifisch sein, dass auf einen Blot verzichtet werden kann (Greene and Straubinger, 2006) und außerdem Aussagen zum Stadium der Krankheit und dem Erfolg der Therapie ermöglichen (Wagner et al., 2012; Pantchev et al., 2015). Das Peptid entspricht der IR6, einer immundominanten Region des VlsE Oberflächen-Lipoproteins und wird nur bei einer Infektion mit Erregervermehrung exprimiert (Levy et al., 2002). ELISAs auf der Basis des C6 Peptids hatten sich schon in der humanmedizinischen Diagnostik gegenüber der bisherigen zweistufigen Diagnostik, bestehend aus ELISA und Blot, sehr bewährt (Bacon et al., 2003; Mogilyansky et al., 2004). Hinzu kommen für Hunde außerdem noch Schnelltests auf unterschiedlicher Antigenbasis und mit verschiedenem Testprinzip (Immunchromatographie, Enzymimmunoassay). Im Vergleich zu immunchromatographischen Verfahren weisen ELISA-basierte Kits durch bidirektionalen Fluss und Enzymverstärkung der Farbreaktion eine höhere Sensitivität und durch den Waschschritt eine höhere Spezifität auf. Bestechend ist bei Schnelltests die sofortige Verfügbarkeit des Ergebnisses nach Blutentnahme in der Tierarztpraxis ohne Probenaufbereitung und Versand bei häufig auch preislichem Vorteil gegenüber der Einsendung in ein zertifiziertes Labor. Allerdings erfolgt in der Regel nur eine einmalige Testung (im Labor dagegen Doppel- bis zu Vierfachbestimmung), die, wie bei anderen Kits auch, im Ergebnis vom verwendeten Antigen beeinflusst wird und in der Tierarztpraxis wohl kaum, noch dazu in Anwesenheit des Tierbesitzers, immer auf Plausibilität hinterfragt werden dürfte. Angaben zum Einsatz dieser Tests gibt es in der wissenschaftlichen Literatur z.B. zu C6-basierten Schnelltests von Krupka et al. (2007), Wagner et al. (2012) und Pantchev et al. (2016).

Im Folgenden werden die Ergebnisse vergleichender Untersuchungen von Hundeseren auf *Borrelia*-Antikörper (AK) dargestellt, die mit zwei ELISAs und den zugehörigen Blots im zweistufigen Verfahren erzielt wurden. Darüber hinaus wurde ein Schnelltest sowie ein ELISA auf der Basis des C6 Antigens eingesetzt.

Material und Methoden

Es standen insgesamt 562 Seren von Hunden zur Verfügung, deren klinische Vorgeschichte unbekannt war. Da Untersuchungen anderer Autoren regelmäßig *Borrelia*-AK-positive Seren in klinisch unauffälligen Hundepopulationen nachweisen konnten (Barth et al., 2012; Leschnik et al., 2013), war hier zu erwarten, dass *Borrelia*-AK-positive Seren zu finden sein sollten. Die Seren wurden vor Gebrauch so aliquotiert, dass ein mehrfaches Auftauen vermieden wurde. Alle Seren wurden mehrfach getestet, allerdings war es auf Grund der in einigen Fällen begrenzten Menge pro Serum nicht möglich, immer alle einbezogenen Kits mit allen zur Verfügung stehenden Seren zu testen. Daraus erklären sich die abweichenden Gesamtzahlen der in den jeweiligen Kombinationen ausgewerteten Ergebnisse der

Seren. Alle hier verwendeten Kits stammen von unterschiedlichen Herstellern. Kit A1 besteht aus einem ELISA zur qualitativen und semiquantitativen Bestimmung von *Borrelia*-IgG-AK in Hunde- und Pferdeseren. Es wird in der Beschreibung darauf verwiesen, dass es sinnvoll ist, zwei Serumproben, eine direkt nach der Infektion (gemeint ist sicher nach dem Auftreten von Symptomen) und eine weitere zwei Wochen später zu entnehmen und parallel zu bestimmen. Weiterhin wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, dass immer das klinische Bild, epidemiologische Daten und gegebenenfalls weitere Laborbefunde in die letztliche Diagnosestellung einbezogen werden sollten. Auf Kreuzreaktionen mit anderen Spirochäten, vor allem Leptospiren, wird ausdrücklich hingewiesen und entsprechende eigene Untersuchungen dazu sowie zu Sensitivität und Spezifität sind enthalten, weiterführende Untersuchungen online zugänglich. Die Testdurchführung ist klar beschrieben, empfohlen werden Seren ohne sichtbare Veränderungen. Nähere Angaben zum verwendeten Antigen gibt es im Testkit nicht, nur den Hinweis, dass Antigen von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto verwendet wurde. Nach den Angaben ist zu vermuten, dass es sich um ein Ganzzellysat-Antigen handelt, wie auf Nachfrage vom Hersteller bestätigt wurde.

Kit A2 ist ein Immunoblot desselben Herstellers, ebenfalls für Hunde- und Pferdeseren zugelassen. Dieser soll eine Verifizierung der ELISA-Ergebnisse erlauben sowie die Unterscheidung einer Feldinfektion von einer Impfung. Die zur Beschichtung verwendeten rekombinanten Antigene (u.a. VlsE-Mix, OspA-Mix, OspC-Mix, DbpA-Mix) sind im Detail aufgeführt unter Angabe der biologischen Bedeutung sowie von deren konkreter Spezifität im Immunoblot. Auch hier ist -wie beim ELISA- der Verweis auf Anamnese und Klinik sowie mögliche Kreuzreaktionen enthalten, ebenso der Hinweis, bei fortbestehendem Verdacht auf eine *Borrelia*-Infektion nach vier bis sechs Wochen erneut Serum zu untersuchen. Die Testbeschreibung einschließlich Auswertung ist übersichtlich und gut nachvollziehbar.

Kit B1 ist ein ELISA auf der Basis rekombinanter *Borrelia*-Antigene zum qualitativen und quantitativen Nachweis von *Borrelia*-spezifischen IgG-AK in Hundeserum oder -plasma. Auf die generelle Problematik von Kreuzreaktionen wird verwiesen. Die hier verwendeten rekombinanten Antigene sollen auch dieses Problem minimieren sowie ansonsten Antigene, die sich in langjährigen Untersuchungen in der Humanmedizin als unterrepräsentiert erwiesen hatten, in ausreichender Menge anbieten. Die eingesetzten Antigene (u.a. OspC, Teil des p41, p100, VlsE, p18) und deren Herstellung mit Hilfe rekombinanter *E. coli* Zellen sind beschrieben. Dies soll erlauben, alle relevanten *Borrelia*-Spezies einzubeziehen und gleichzeitig ermöglichen, wie aus humanmedizinischen Studien bekannt, ansonsten unterrepräsentierte Antigene mit zu präsentieren. Auf die Einbeziehung von Anamnese und klinischem Bild wird verwiesen, eine Abklärung positiver Resultate mittels Blot sowie eine Wiederholungsuntersuchung bei fortbestehendem Verdacht auf eine *Borrelia*-Infektion wird empfohlen. Darüber hinaus wird auf das Persistieren der IgG-Antikörper über einen längeren Zeitraum hingewiesen. Weitere Validierungsdaten ergänzen die Fachinformationen. Die Testdurchführung und –auswertung ist übersichtlich beschrieben.

Vom selben Hersteller wird ein Immunoblot auf der Basis des Westernblotting zur Bestimmung der *Borrelia*-IgG-AK angeboten (Kit B2) und ausdrücklich zur Bestätigung von im ELISA-Screening positiven oder fraglichen Proben empfohlen, wobei auch hier die Auswahl der Antigene (u.a. p100, VlsE, OspA, OspC, p18) weitere Hinweise zum Stadium der Infektion ermöglichen, z.B. der Nachweis von *Borrelia*-AK gegen OspA bei immunisierten Hunden. Wie beim ELISA sind Daten zu einer kleinen Infektions- (acht Tiere) sowie zu einer Seroprävalenzstudie klinisch unauffälliger Hunde mit etwas mehr als 100 Tieren angeführt, wobei bei Letzteren bei 54,7 % *Borrelia*-AK-positive Seren klassifiziert wurden. Die entsprechenden Studienergebnisse sind angefügt. Auf die Grenzen der Methode (Einbeziehung Klinik, Anamnese, gegebenenfalls wiederholte Untersuchungen, Kreuzreaktionen, Persistieren der IgG-AK) wird eingegangen. Die Testdurchführung und –auswertung ist gut und übersichtlich beschrieben.

Vom selben Hersteller gibt es auch ELISA und Blot zur Bestimmung von IgM-AK gegen Borrelien, diese Kits wurden jedoch nicht mit in die Auswertung einbezogen, da damit nur sehr wenige Seren untersucht und außerdem keine Kit-Chargen anderer Hersteller geprüft worden waren.

Der Kit C ist als Schnelltest mit Testkassette ausgelegt, soll zum Nachweis von *Borrelia*-Feldantikörpern eingesetzt werden und wird ab drei bis vier Wochen nach einer vermuteten Infektion empfohlen. Als optimales Probenmaterial werden frisch gewonnenes Serum, Plasma oder Vollblutüberstand (gemeint ist sicher das Serum nach Absetzen des Blutkuchens ohne Zentrifugation) empfohlen, aber auch mit Vollblut (auch Heparin- oder EDTA-Blut) ist eine Testung möglich. Der Testablauf ist klar beschrieben und einfach durchzuführen. Zum Kit C macht der Hersteller keine Angaben zum verwendeten Antigen, weder in der Gebrauchsanweisung, noch auf der Homepage. Weitere Hinweise, u.a. zu eigenen Validierungsstudien, Infektionsversuchen etc. sind nicht verfügbar.

Ein Teil der Seren wurde auch mit einem ELISA auf der Basis des C6-Antigens getestet (Kit D). Das C6-Antigen gewährleistet, dass nur Feldinfektionen detektiert und dadurch Seren geimpfter Tiere nicht als positiv erfasst werden. Der Testablauf und die Auswertung sind gut und übersichtlich beschrieben, Angaben zu eigenen Studien sind nicht enthalten, jedoch in der allgemein zugänglichen Literatur einzusehen (u.a. Levy et al., 2002; 2008).

Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung der Merkmale der zu vergleichenden Tests wurde der Fisher's Exact Test angewendet. Dazu wurde die im Internet frei verfügbare Software von Langsrud genutzt, die alle verfügbaren Wahrscheinlichkeitswerte (p-Werte) ausweist (http://www.langsrud.com/stat/Fishertest.htm), die Berechnung erfolgte nach Agresti (1992). Die jeweils in einer Vierfelder-Anordnung sich befindenden zwei Vergleichstests wurden dann dahingehend beurteilt, wie sie sich tendenziell im Vergleich ihrer p-Werte zum p-Wert eines „idealen Tests" mit einem „idealen Goldstandard" (je 250 richtig positive und 250 richtig negative Werte) verhalten. Eine diesbezügliche Rangfolge wurde erstellt und wird diskutiert.

Ergebnisse

Zunächst wurden die ELISAs der Kits A1 und B1 mit den Blots A2 und B2 durchgeführt. In Abweichung zu der sonst üblichen Praxis wurden auch die im ELISA negativen Seren im Blot getestet, um zu prüfen, ob der ELISA zuverlässig als Screening alle potentiell positiven Proben erfasst. In der Auswertung wurden die -im ELISA als grenzwertig bewerteten Ergebnisse- den positiven ELISA-Resultaten zugeordnet. Eine Zuordnung zu den negativen Ergebnissen ergab nur geringfügige Abweichungen zu den hier dargestellten Resultaten und wurde deshalb hier nicht im Detail aufgeführt. Konkret waren bei Kit A 19 von 561 Seren grenzwertig, bei Kit B 23 von 537 Seren und bei Kit C und D gab es keine grenzwertigen Ergebnisse. In praxi würde man auch so verfahren, grenzwertige ELISA-Ergebnisse zur Sicherheit im Immunoblot abzuklären, weshalb wir diese Variante für unsere Auswertungen gewählt haben.

Im Weiteren werden Seren, die sowohl im ELISA als auch im Blot positiv reagierten, als „spezifisch positiv" bezeichnet. Seren, die lediglich im ELISA positiv reagierten, dann aber im anschließenden Blot negativ waren, werden als „unspezifisch positiv" bezeichnet, da sich im spezifischeren Test (Blot) kein positives Ergebnis erzielen ließ. Bei Kit A (Tab. 1) konnten von 185 im ELISA als positiv eingestuften Seren 115 im Blot als spezifisch positiv bestätigt werden (62,2 %). Kein einziges Serum, das im ELISA negativ war (376), wurde im Blot als positiv eingestuft. Das entsprach dem theoretisch zu erwartenden Ergebnis eines zweistufigen Verfahrens mit vorgeschaltetem ELISA-Screening und anschließendem Blot. Somit wurden 20,5 % der 561 untersuchten Seren als spezifisch *Borrelia*-AK-positiv bewertet.

Kit B zeigte etwas abweichende Ergebnisse (Tab. 2): Von 537 Seren wurden 222 im ELISA als positiv eingestuft, im Blot fielen lediglich 10 Seren als unspezifisch positiv auf, die im Blot als negativ eingestuft worden waren, für 212 Seren wurde das Ergebnis aus dem ELISA als *Borrelia*-Antikörper-positiv mittels Blot bestätigt (spezifisch positiv). Sechs weitere Seren waren im ELISA negativ, aber im Blot positiv und wären somit bei einem zweistufigen Verfahren, bestehend aus ELISA-Screening und anschließendem Blotting der im ELISA positiven Seren normalerweise nicht detektiert worden. Damit wurden mit 39,5 % deutlich mehr Seren durch eine positive Reaktion im ELISA, die im Blot als positiv bestätigt wurde, als spezifisch positiv deklariert, als das bei Kit A aus dem gleichen Pool von Seren der Fall war (Tab. 2).

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse der beiden Blots A2 und B2 (Tab. 3) kommt zu einem doch recht überraschenden Ergebnis: Von 532 Seren wurden immerhin bei 151 Seren (28,4 %) abweichende Ergebnisse zwischen den beiden Kits A2 und B2 verzeichnet. Insbesondere war auffallend, dass mit dem Blot von Kit B2 134 Seren als positiv deklariert wurden, die mit dem Blot von Kit A2 als negativ bewertet wurden. Nur 71,6 % der Ergebnisse waren deckungsgleich, wobei die als geimpft eingestuften Tiere des Kits A2 den positiven Proben zugerechnet wurden, da auch bei Kit B2 die Seren mit Bezug zu einer Immunisierung nicht gesondert ausgewiesen wurden. Dieser Vergleich bezieht sich also nur auf den stattgehabten Antigenkontakt, ganz gleich, ob dieser auf eine Infektion oder eine vorherige Immunisierung zurückzuführen war, was angesichts der Tatsache, dass klinische Daten zu den Seren (Symptome?; Impfung?) nicht vorlagen, als sinnvollster Vergleich erschien.

Vergleicht man nun die beiden Kits A und B (ELISA mit anschließendem Blot) jeweils mit dem Schnelltest (Kit C), so werden bei Kit A zu Kit C lediglich in 68,9 % übereinstimmende Ergebnisse erzielt, bei Kit B zu Kit C nur in 62 % der untersuchten Seren Übereinstimmung festgestellt (Tab. 4 und 5). Besonders auffällig war, dass von 95 im Blot A2 positiven Seren 38 (40 %) auch im Schnelltest positiv waren, dagegen von 141 im Schnelltest positiven Seren nur 38 (27 %) im Blot A2 als spezifisch positiv bestätigt werden konnten. Für Blot B2 ergaben sich folgende Werte: Von 195 im Blot B2 positiv bewerteten Seren wurden 72 (36,9 %) auch im Schnelltest als positiv erfasst, dagegen konnten von 137 im Schnelltest positiven Seren im Blot nur 52,6 % als spezifisch positiv bestätigt werden (Tab. 5). Diese geringe Übereinstimmung der Ergebnisse spiegelt sich auch in Tabelle 8 wider (Rang 5 von 1 – größte Übereinstimmung bis 6 – geringste Übereinstimmung).

TABELLE 1: *Untersuchung von Hundeseren auf Borrelia-Antikörper mit unterschiedlichen Testkits: Vierfeldertafel zum Vergleich ELISA Kit A1 mit Blot Kit A2*

		Kit A1 positiv	Kit A1 negativ	gesamt
Kit A2	positiv	115	0	115
Kit A2	negativ	70	376	446
gesamt		185	376	561

TABELLE 2: *Untersuchung von Hundeseren auf Borrelia-Antikörper mit unterschiedlichen Testkits: Vierfeldertafel zum Vergleich ELISA Kit B1 mit Blot Kit B2*

		Kit B1 positiv	Kit B1 negativ	gesamt
Kit B2	positiv	212	6	218
Kit B2	negativ	10	309	319
gesamt		222	315	537

TABELLE 3: *Untersuchung von Hundeseren auf Borrelia-Antikörper mit unterschiedlichen Testkits: Vierfeldertafel zum Vergleich Kit A2 (Blot) mit Kit B2 (Blot)*

		Kit A2 positiv	Kit A2 negativ	gesamt
Kit B2	positiv	77	134	211
Kit B2	negativ	17	304	321
gesamt		94	438	532

TABELLE 4: *Untersuchung von Hundeseren auf Borrelia-Antikörper mit unterschiedlichen Testkits: Vierfeldertafel zum Vergleich Kit A (ELISA und Blot) mit Kit C (Schnelltest)*

		Kit C positiv	Kit C negativ	gesamt
Kit B	positiv	38	57	95
Kit B	negativ	103	316	419
gesamt		141	373	514

Im Vergleich der Kits A und B mit dem C6-ELISA (Kit D) stellten sich die Ergebnisse wie folgt dar (Tab. 6 und 7): Die Kits A und D zeigten in 83,8 % übereinstimmende Ergebnisse, die Abweichungen von 16,2 % sind sicher einerseits den mit Kit D nicht erfassten immunisierten Tieren geschuldet und andererseits dem Umstand zuzuschreiben, dass einige sehr niedrig positive Seren im Kit D nicht erfasst werden (Levy et al., 2008). Zieht man die im Blot A2 nur als Antwort auf eine Immunisierung zu interpretierenden Ergebnisse von 23 Seren ab, ergibt sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse von Kit A zu Kit D von 88,9 % (Tab. 6, Werte in Klammern). Mit Kit A wurden 21,0 % der Seren als positiv bewertet, nach Abzug der immunisierten Tiere waren es 15,9 %, bei Kit D waren es 7,5 %. Generell kann man sicher unter Berücksichtigung der obigen Anmerkungen damit im Wesentlichen von einer Übereinstimmung der Ergebnisse beider Kits sprechen, sofern die bei Kit A im ELISA generierten positiven Ergebnisse mittels Blot verifiziert und die immunisierten Tiere selektiert werden.

Beim Vergleich von Kit B und D gab es in 68,5 % eine Übereinstimmung der Ergebnisse (Tab. 7). Die Abweichung von 31,5 % der Probeneinstufung wurde vor allem dadurch hervorgerufen, dass von 160 mit Kit B2 als positiv bewerteten Proben nur 29 mit Kit D als positiv eingestuft wurden und 131 als negativ zu bewerten waren. Dagegen wurden nur vier der mit Kit B2 als negativ bewerteten Proben abweichend davon mit Kit D dennoch als positiv bewertet. Dieser hohe Anteil von 37,4 % positiver Proben bei Kit B2 zu nur 7,7 % positiver Bewertung bei Kit D kann nicht nur durch die oben angeführten Erläuterungen erklärt werden und scheint vermutlich auch dem bei Kit B verwendeten Antigen geschuldet zu sein. Möglicherweise sind die in der Humanmedizin gesammelten Erfahrungen bezüglich einer optimierten Antigenpräsentation auf die Diagnostik beim Hund doch so nicht völlig übertragbar. Die im Vergleich dazu relativ hohe Übereinstimmung zwischen Kit A und D spricht ebenfalls dafür, dass mit Kit B eine ganze Reihe unspezifisch positiver Ergebnisse angefallen sind.

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse sind in Tabelle 8 die Signifikanzwerte aus dem Fisher's Exact Test für die 2x2 Tabellen drei bis sieben, in denen die Kits untereinander verglichen wurden, gegenübergestellt und eine Rangfolge vergeben. Danach zeigen die Kits A und B sowie A und D die höchsten Übereinstimmungen, während der Vergleich der Kits A und auch B zum Schnelltest Kit C die ungünstigsten Ergebnisse liefert.

TABELLE 5: *Untersuchung von Hundeseren auf Borrelia-Antikörper mit unterschiedlichen Testkits: Vierfeldertafel zum Vergleich Kit B (ELISA und Blot) mit Kit C (Schnelltest)*

		Kit C positiv	Kit C negativ	gesamt
Kit B	positiv	72	123	195
Kit B	negativ	65	235	300
gesamt		137	358	495

TABELLE 6: *Untersuchung von Hundeseren auf Borrelia-Antikörper mit unterschiedlichen Testkits: Vierfeldertafel zum Vergleich Kit A (ELISA und Blot) mit Kit D (ELISA C6-Antigen)*

		Kit A positiv	Kit A negativ	gesamt
Kit D	positiv	28	6	34
Kit D	negativ	67 (44)	3351 (374)	418
gesamt		95 (72)	357 (380)	452

in Klammern: immunisierte Tiere als negativ bewertet

TABELLE 7: *Untersuchung von Hundeseren auf Borrelia-Antikörper mit unterschiedlichen Testkits: Vierfeldertafel zum Vergleich Kit B (ELISA und Blot) mit Kit D (ELISA C6-Antigen)*

		Kit B positiv	Kit B negativ	gesamt
Kit D	positiv	29	4	33
Kit D	negativ	131	264	395
gesamt		160	268	428

TABELLE 8: *Untersuchung von Hundeseren auf Borrelia-Antikörper mit unterschiedlichen Testkits, Rangfolge idealer Test: Vergleich der Signifikanzwerte aus dem Fisher's Exact Test**

Tabelle	Kits geprüft	2x2-Werte	Signifikanzniveau	Rang idealer Test, Platz
3	A–B	77/134/17/304	p=3,9779 x 10-20	1
4	A–C	38/57/103/316	p=0,003295	6
5	B–C	72/123/65/235	p=0,0003023	5
6	A–D	28/6/67/351	p=1,49265 x 10-15	3
6 in Klammern	A–D	28/6/44/374	p=1,74313 x 10-19	2
7	B–D	29/4/131/264	p=6,333068 x 10-10	4
Zum Vergleich: Fiktiver idealer Test	100 % Übereinstimmung	250/0/0/250	p=1,7131 x 10-149	

*Die Einbeziehung der Tabellen 1 und 2 war nicht sinnvoll, da dort nur das Verhältnis von ELISA zu Blot im eigenen System dargestellt wird

Diskussion

Das Dilemma der *Borrelia*-Diagnostik beim Hund wird durch das unklare klinische Bild, ungenaue serologische Tests und die recht häufigen Kreuzreaktionen mit verwandten Erregern verursacht (Gerber et al., 2009). Wie stark der Einfluss der zum Einsatz kommenden labordiagnostischen Methoden bei der Diagnosestellung sein kann, zeigen die beschriebenen Untersuchungen. Daher sind neben einer Borrelien-Infektion oder Immunisierung potentielle Kreuzreaktionen, vor allem gegen Leptospiren, und die Entscheidung für einen Kit und damit eine bestimmte Art der Antigenpräparation und -beschichtung, sowie die Bewertung der Banden entscheidend. Dies verdeutlicht der Vergleich der Kits A und B sowie der Kits A und B in Bezug zu Kit C (Tab. 3, 4 und 5).

Insgesamt muß nochmals betont werden, dass die Ergebnisse der Serologie lediglich als eine Komponente zur Diagnosestellung betrachtet werden sollten, wie anhand der z.T. doch sehr unterschiedlichen Resultate gezeigt wurde.

Unentbehrlich bleibt der praktische Tierarzt, der aus Anamnese, klinischem Befund und letztlich auch mit Hilfe der Laborergebnisse aus dem Gesamtbild des Patienten zu einer Diagnosestellung kommt (die mitunter auch lauten kann: serologisch positiv und gesund, keine Behandlung notwendig) und daraus ggf. resultierend eine angemessene Therapie durchführen wird.

Es ist für die auf dem Gebiet der Veterinärdiagnostik tätigen Firmen sicher keine leichte Aufgabe, die Diagnostik fortzuentwickeln, da Referenzseren kaum verfügbar sind und unspezifisch positive Reaktionen offensichtlich immer wieder auftreten können. Die Auswertung der Blots war trotz guter Arbeitsanleitung in einigen wenigen Fällen nicht ganz eindeutig. Die Untersuchung musste in diesen Fällen wiederholt werden. Deshalb sollte gerade bei der Auswertung der Blots nur speziell geschultes Personal mit entsprechender ausreichender Routine eingesetzt werden.

Insbesondere die mittels Schnelltest (Kit C) erzielten Ergebnisse wichen erheblich von den Ergebnissen der zweistufigen Kits A und B ab. Ob diese starken Abweichungen von den anderen geprüften Kits durch die Antigenbeschichtung des Schnelltests verursacht waren, kann wegen fehlender näherer Angaben dazu nicht genauer spezifiziert werden. Dass die Tatsache, dass ausschließlich tiefgefroren gelagerte Seren verwendet wurden, der Auslöser dafür sein könnte, ist auf Grund der sehr ungerichteten Abweichungen bei gleicher Probenbehandlung sehr unwahrscheinlich, aber nicht völlig auszuschließen. Es scheint aber sehr unwahrscheinlich, dass das Lagern allein einen solchen Einfluss haben soll.

In Tabelle 8 sind alle Ergebnisse, die mit den unterschiedlichen Kits erzielt wurden, mittels der Signifikanzwerte nach dem Fisher's Exact Test entsprechend des Grades ihrer Übereinstimmung geordnet worden (Rang 1: größte Übereinstimmung der Ergebnisse, dann absteigend bis Rang 6). Auch hier wird deutlich, dass die Übereinstimmung zwischen den Kits A (zweistufiges Verfahren mit ELISA und Blot) und D (ELISA auf der Basis des C6-Antigens) trotz der unterschiedlichen Antigenpräparationen vergleichsweise hoch war (Rang 1-3), dagegen zum Schnelltest (Kit C) außerordentlich gering ausfiel.

Auf Grund des deutlich geringeren Kosten- und Arbeitsaufwandes für den ELISA sollte es derzeit beim zweistufigen Verfahren aus ELISA-Screening und anschließendem Blotting der im ELISA positiven Proben bleiben und auf den Blot nicht generell verzichtet werden. Immerhin konnten z.B. mit Kit A (Tab. 1) von 561 Seren sofort 376 mit geringem Aufwand als negativ befundet werden. Bei den 185 im Blot weiter untersuchten Proben waren dann tatsächlich nur 115 positiv. Damit konnten immerhin 70 Tieren mit im Blot negativen Seren therapeutische Interventionen erspart bleiben, die u.U. auf Grund eines alleinigen ELISA-Ergebnisses durchgeführt worden wären. Insofern dürfte dieser Aufwand auch künftig zu vertreten sein.

Der C6-ELISA (hier Kit D) könnte bei breiter Anwendung eine Vereinfachung und Erleichterung bei der Diagnostik von *Borrelia*-Infektionen beim Hund darstellen, da immunisierte Tiere nicht erfasst und die arbeitsaufwändigen Blots zur Verifizierung positiver ELISA-Ergebnisse eingespart werden können und letztlich nur noch bei speziellen Fragestellungen erforderlich wären, z.B. dem Nachweis von Impfantikörpern nach einer Immunisierung.

Es ist festzustellen, dass die Entwicklung und Validierung entsprechender Testkits vor allem durch die wenigen verfügbaren Referenzseren aus experimentellen Infektionen erschwert wird. Zukünftig ist es den Firmen überlassen, ob und in welchem Umfang vergleichende Untersuchungen noch durchgeführt werden, da für diesen Bereich der Veterinärdiagnostik seit dem 1. Januar 2015 die Zulassungs- und Chargenprüfungspflicht entfallen ist. Auch wenn mit der Zulassung und Chargenprüfung der Mangel an Referenzseren nicht wettgemacht werden konnte, war doch zumindest außerhalb des Herstellers eine Qualitätsüberprüfung möglich. Wobei häufig Hinweise zur weiteren Entwicklung resultierten und (in seltenen Fällen) auch einmal eine Charge verworfen oder nachgebessert werden musste. Das wird künftig nicht mehr möglich sein. Aus diesem Grund sollten die obigen vergleichenden Untersuchungen aus mehrjährigen Arbeiten auf dem Gebiet der *Borrelia*-Serologie beim Hund trotz aller Einschränkungen (nicht klassifiziertes Ausgangsmaterial, nicht alle Seren mit allen Kits geprüft etc.) allgemein zugänglich gemacht werden. Damit betonen wir die Bedeutung der kritischen Betrachtung der Laborergebnisse in der Praxis, die niemals getrennt von den klinischen Befunden und den anamnestischen Erhebungen erfolgen sollte. Den Anwendern ist in Zeiten ohne Zulassungs- und Chargenprüfung zu empfehlen, bevorzugt auf Kits zurück zu greifen, deren Brauchbarkeit in Zeitschriften mit Gutachtersystem zunächst geprüft und danach publiziert wurde. Den Firmen ist anzuraten, wissenschaftliche Publikationen, in denen ihre Kits geprüft wurden, tatsächlich als Referenz für ihr Produkt in den Gebrauchsanleitungen anzugeben bzw., sofern das noch nicht geschehen ist, sich an wissenschaftlichen Vergleichsstudien zu beteiligen als gute Möglichkeit, die Qualität ihres Produktes zu präsentieren.

Conflict of interest

Es bestehen keine geschützten finanziellen, beruflichen oder anderen persönlichen Interessen an einem Produkt, Service und/oder einer Firma, welche die in diesem Manuskript dargestellten Inhalte oder Meinungen beeinflussen könnten.

Literatur

Agresti A, (1992): A Survey of Exact Inference for Contegency Tables. Statitical Science 7: 131–153

Bacon RM, Biggerstaff BJ, Schriefer ME, Gilmore RD Jr, Philipp MT, Steere AC, Wormser GP, Marques AR, Johnson BJ (2003): Serodiagnosis of Lyme disease by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant VlsE1 or peptide antigens of *Borrelia burgdorferi* compared with 2-tiered testing using whole-cell lysates. J Infect Dis. 187: 1187–1199.

Barth C, Straubinger RK, Sauter-Louis C, Hartmann K (2012): Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* and their clinical relevance in dogs in Munich, Germany. Berl Muench Tieraerztl Wochenschr 125: 337–344.

Friedrich-Loeffler-Institut (2016): Leitlinie zur Impfung von Kleintieren. https://www.fli.de/de/kommissionen/stiko-vet/empfehlungen/, 37–39.

Gerber B, Eichenberger S, Haug K, Wittenbrink MM (2009): Das Dilemma der Lyme Borreliose beim Hund unter besonderer Berücksichtigung der „Lyme Nephritis". Schweiz Arch Tierheilkd 151: 479–483.

Greene CE, Straubinger RK (2006): Borreliosis. In: Infectious diseases of the dog and the cat. Ed: Greene, CE, Saunders Elsevier, St. Louis, 417–435.

Hengge UR, Tannapfel A, Tyring SK, Erbel R, Arendt G, Ruzicka T (2003): Lyme borreliosis. Lancet Infect Dis 3: 489–500.

Krupka I, Pantchev N, Lorentzen L, Weise M, Straubinger RK (2007): Durch Zecken übertragbare bakterielle Infektionen bei Hunden: Seroprävalenzen von Anaplasma phagocytophilum, *Borrelia burgdorferi* sensu lato und Ehrlichia canis in Deutschland. Prakt Tierarzt 88:776–787.

Krupka I, Straubinger RK (2010): Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Vet Clin Small Anim 40: 1103–1119.

Leschnik M, Feiler A, Duscher GG, Joachim A (2013): Effect of owner-controlled acaricidal treatment on tick infestation and immune response to tick-borne pathogens in naturally infested dogs from Eastern Austria. Parasit Vectors 9:62. doi: 10.1186/1756-3305-6-62.

Levy S, O'Connor TP, Hanscom JL, Shields P (2002): Utility of an in-office C6 ELISA test kit for determination of infection status of dogs naturally exposed to *Borrelia burgdorferi*. Vet Ther 3: 308–315.

Levy SA, O'Connor TP, Hanscom JL, Shields P, Lorentzen L, Dimarco AA (2008): Quantitative measurement of C6 antibody following antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi* antibody-positive nonclinical dogs. Clin Vaccine Immunol. 15: 115–119.

Littman MP, Goldstein RE, Labato MA, Lappin, MR, Moore GE (2006): ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. J Vet Intern Med 20: 422–434.

Littman MP (2013): Lyme nephritis. J Vet Emerg Crit Care 23:163–173.

Nather S, Globokar M, Frisch T, Huisinga E, Pantchev N (2016): Frühe Marker für Lyme-Nephritis beim Hund: Korreliert die quantitative Serologie mit SDMA? 24. Jahrestagung der FG Innere Medizin und klinische Labordiagnostik der DVG (InnLab), Berlin 2016. Abstract in: Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 44: 12–13.

Mogilyansky E, Loa CC, Adelson ME, Mordechai E, Tilton RC (2004): Comparison of Western immunoblotting and the C6 Lyme antibody test for laboratory detection of Lyme disease. Clin Diagn Lab Immunol 11: 924–929.

Pantchev N, Pluta S, Huisinga E, Nather S, Scheufelen M, Vrhovec MG, Schweinitz A, Hampel H, Straubinger RK (2015): Tick-borne Diseases (Borreliosis, Anaplasmosis, Babesiosis) in German and Austrian Dogs: Status quo and Review of Distribution, Transmission, Clinical Findings, Diagnostics and Prophylaxis. Parasitol Res 114, Suppl 1, S19:54. doi: 10.1007/s00436-015-4513–0.

Pantchev N, Vrhovec MG, Pluta S, Straubinger RK (2016): Seropositivity of *Borrelia burgdorferi* in a cohort of symptomatic cats from Europe based on a C6-peptide assay with discussion of implications in disease aetiology. Berl Muench Tieraerztl Wochenschr 129: 333–339.

Preyß-Jägeler C, Müller E, Straubinger RK, Hartmann K (2016): Prävalenz von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi*, Anaplasma phagocytophilum und bestimmmte Leptospira-interrogans-Serovare bei Berner Sennenhunden. Tieraerztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 44: 77–85.

Wagner B, Freer H, Rollins A, Garcia-Tapia D, Erb HN, Earnhart C, Marconi R, Meeus P (2012): Antibodies to *Borrelia burgdorferi* OspA, OspC, OspF, and C6 antigens as markers for early and late infection in dogs. Clin Vaccine Immunol 19: 527–535.

Wilking H, Stark K (2014): Trends in surveillance data of human Lyme borreliosis from six federal states in eastern Germany, 2009-2012. Ticks Tick Borne Dis 5: 219–224.

Korrespondenzadresse:
Dr. med. vet. habil. Christine Klaus
Friedrich-Loeffler-Institut
Institut für bakterielle Infektionen und Zoonosen
Naumburger Str. 96a
07743 Jena
christine.klaus@fli.de