# Borreliose - Immunreaktionen und Labordiagnostik

**Dr. med. univ. Kurt Kraus**

Laborarzt

**MVZ** Laborzentrum Ettlingen GmbH

Otto-Hahn-Straße18 • 76275 Ettlingen

# Inhalt

- Ablauf einer Borrelien-Infektion
- Immunologische Reaktion vom Typ 1
- Immunologische Reaktion vom Typ 2
- Nachweisverfahren
  - Nachweis Borrelien-spezifischer Antikörper
  - Nachweis der zellulären Immunreaktion
  - Direkte Nachweisverfahren in der Routine

# Ablauf einer Borrelien-Infektion

1. Nach Inokulation **Phagozytose** der Borrelien durch **Antigen präsentierende Zellen (APC)**

   Zu den APC gehören
   - Dendritische Zellen
   - Makrophagen
   - B-Lymphozyten

2. Kontakt der APC's mit spezifisch reagierenden T-Lymphozyten

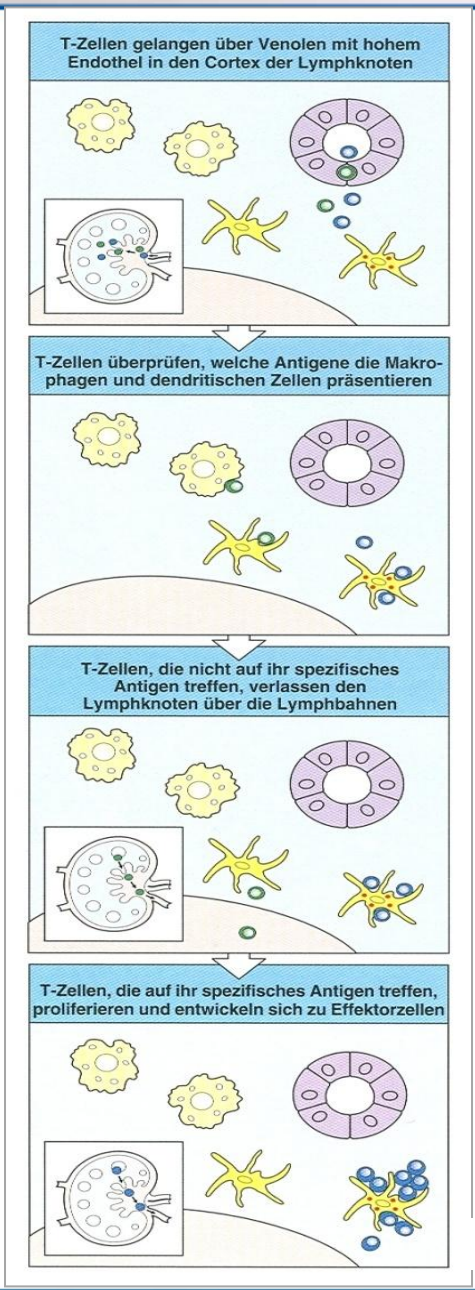
3. Klonale Proliferation der naiven Zellen, danach Transformation der Lymphozyten zu **Effektorzellen**

4. Freisetzung von Zytokinen und Steuerung immunologischer Reaktionen

# Primärinfektion

Naive Zellen = T-Lymphozyten ohne immunologisches Gedächtnis
→ langsame Zellvermehrung

Naive T-Zellen treffen während ihrer Wanderung durch die peripheren Lymphorgane auf Antigene.




Janeway, Ch. / Immunologie

**Effektorzellen** = Th1- und Th2-Zellen

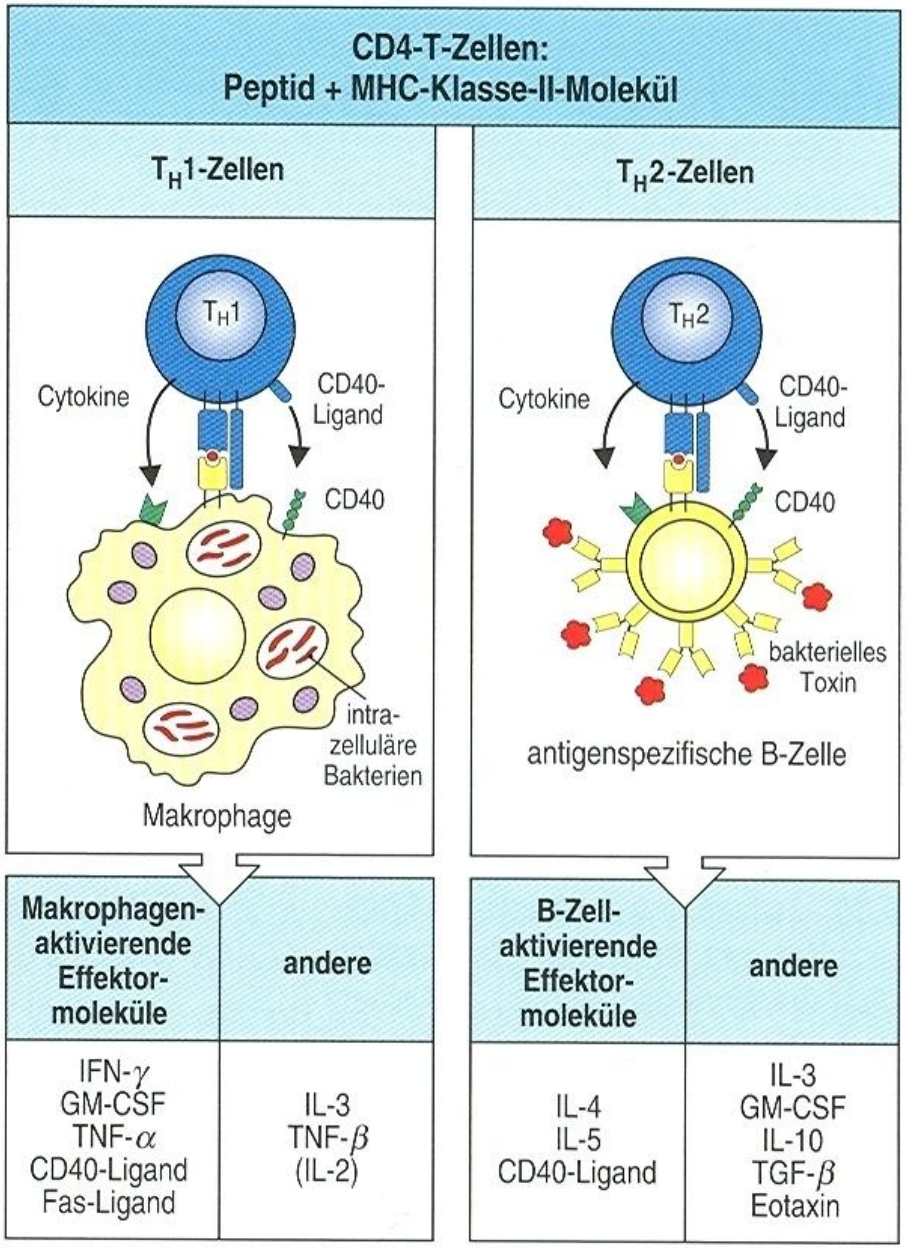
**Th1-Zellen** setzen **Zytokin Interferon gamma** frei; dieses aktiviert Makrophagen und supprimiert B-Lymphozyten

**Th2-Zellen** setzen **Zytokine Interleukin 4 und 5** frei; diese aktivieren B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen, d.h. Bildung von Antikörpern, und supprimieren Makrophagen.

Nach abgelaufener Infektion gehen Effektorzellen durch Apoptose zugrunde; es bleiben **Gedächtnis-zellen.**

Immunol. Reaktion Typ 1

Immunol. Reaktion Typ 2




Die wichtigsten Arten bewaffneter T-Effektorzellen synthetisieren verschiedene Effektormoleküle.

Janeway, Ch. / Immunologie

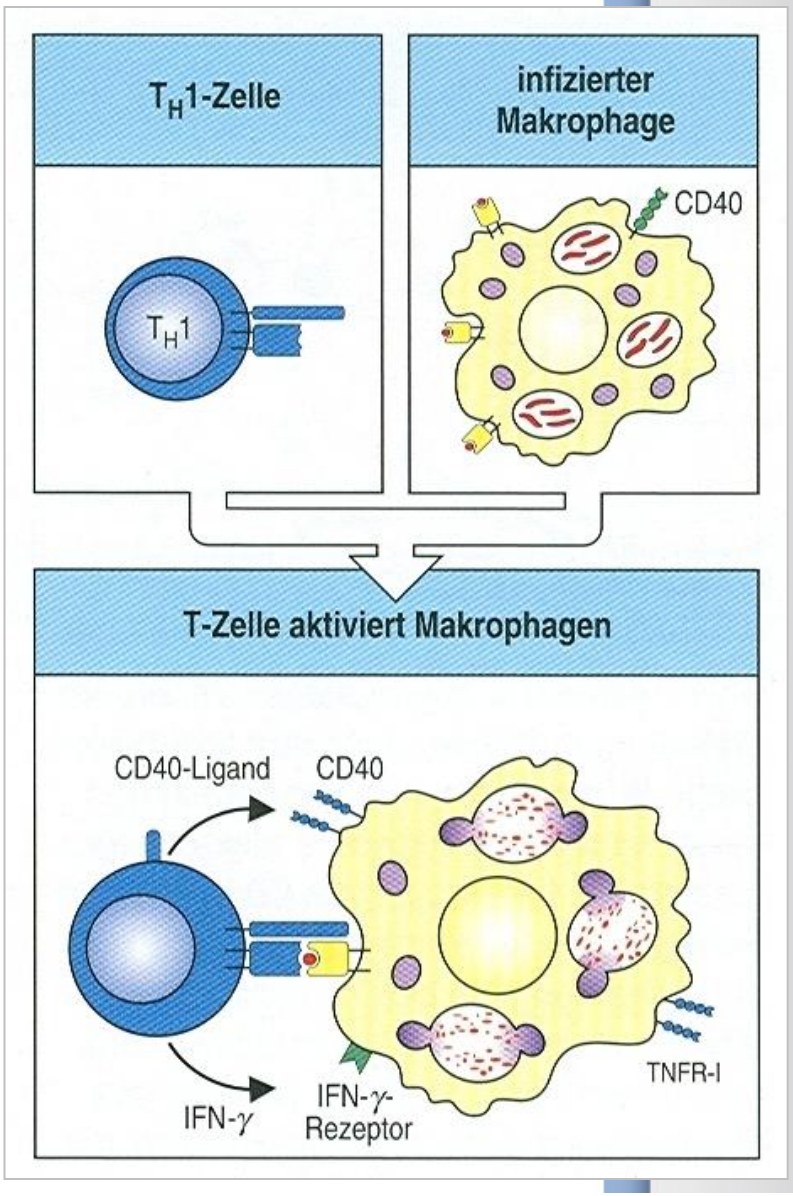
# Immunologische Reaktion vom Typ 1

Nach Borrelien-Infektion mehrheitlich **immunologische Reaktion Typ 1** → Freisetzung von **Interferon gamma (IFN-γ)** aus Th1-Zellen

**Wirkungen des Interferon gamma**:

- Stimuliert Vermehrung der Makrophagen
- Bewirkt intrazelluläre Verdauung der phagozytierten Borrelien (ohne IFN-γ zwar Phagozytose, aber keine intrazelluläre Verdauung)

TH1-Zellen aktivieren Makrophagen so, dass diese stark antimikrobiell wirken.




Janeway, Ch. / Immunologie

## Interferon gamma

stimuliert in Makrophagen die induzierbare **Stickoxid-Synthase**, welche über Arginin-Citrullin-Zyklus die Synthese des hoch-reaktiven Stickoxid-Radikals (**NO-Radikals**) katalysiert.

$$\text{Arginin} + O_2 \xrightarrow{\text{NO-Synthase}} NO\bullet + \text{Citrullin}$$

Physiologische Wirkung des NO-Radikals:
Abtöten von Krankheitserregern

NO-Radikal kann mit Superoxid-Anion zum Peroxy-nitrit-Anion reagieren

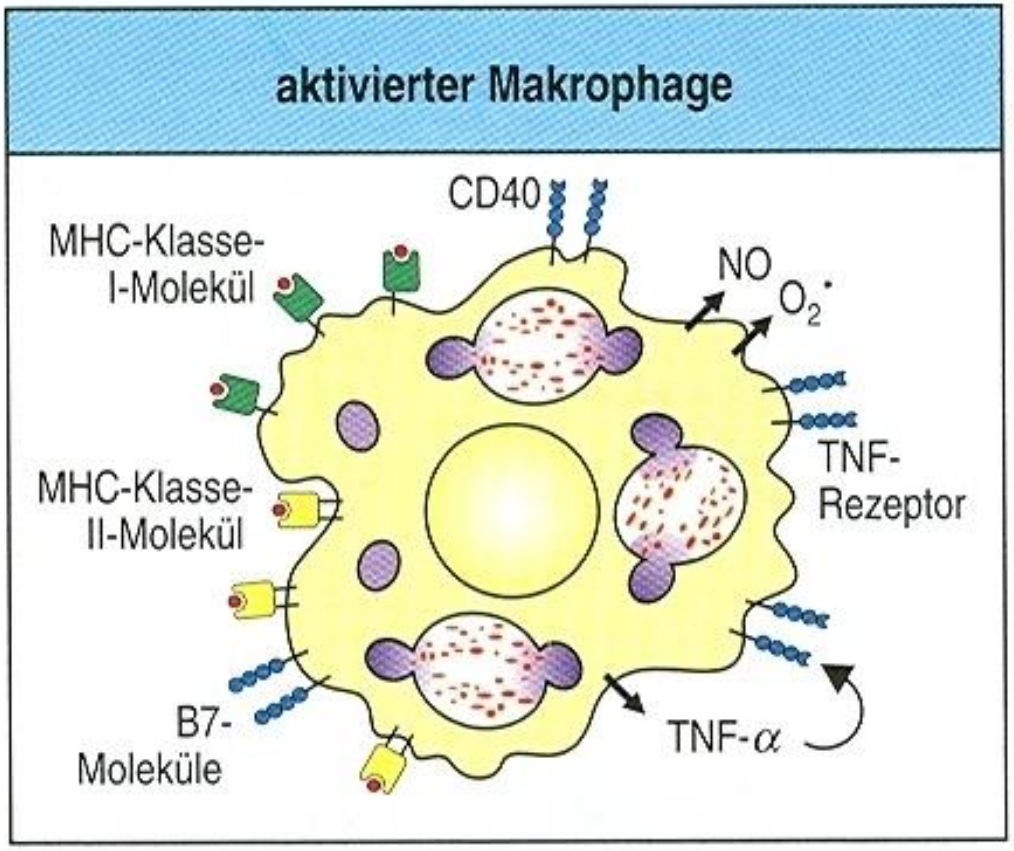
$$NO\bullet + O_2^{-}\bullet \xrightarrow{SOD?} ONOO^{-}$$

NO-Radikal und Peroxynitrit-Anion hemmen Enzyme des Zitronensäure-Zyklus und der mitochondrialen Atmungskette und damit die Energiegewinnung betroffener Zellen (insbes. von Neuronen). Schädigung der Membran- und Proteinstrukturen von Zellen (u. a. die innere Mitochondrienmembran)

<u>Folge:</u>

zelluläre Funktionsstörung (z.B. Erregungsleitungs-störungen) bis zum Zelltod; betroffen sind Neuronen und andere Zellen (z. B. Bindegewebszellen der Gelenkskapseln).

nitrosativer Stress




Aktivierte Makrophagen verändern sich in einer Weise, dass ihre antimikrobielle Wirkung und ihre Immunreaktion verstärkt werden.

Janeway, Ch. / Immunologie

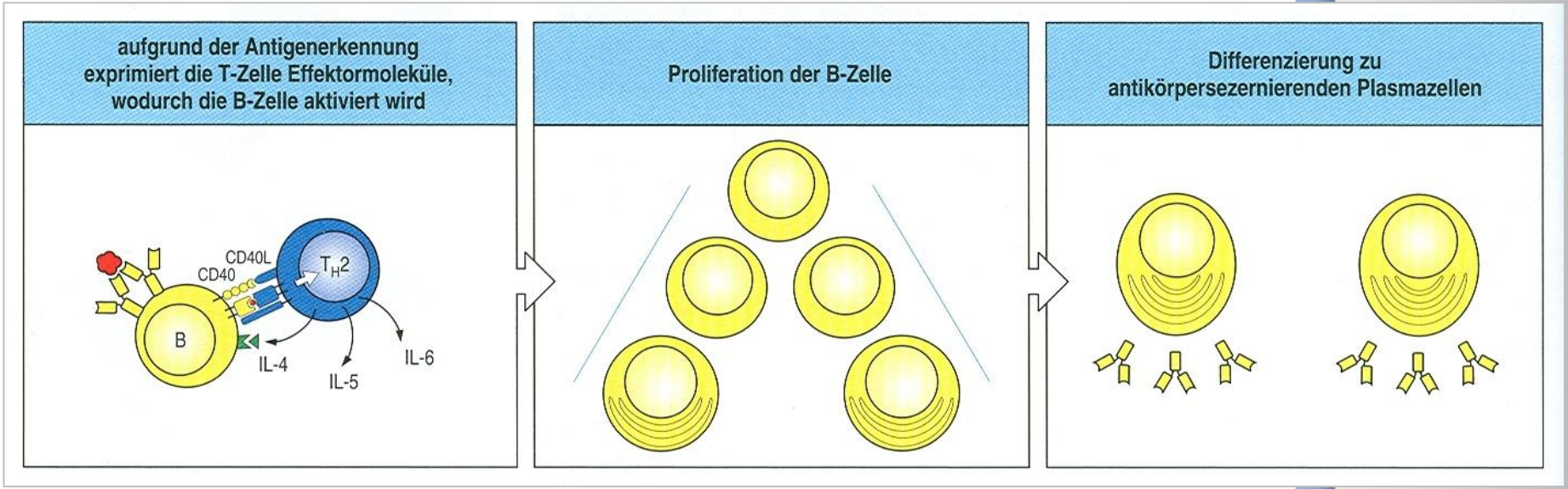
# Immunologische Reaktion vom Typ 2

Nach Borrelien-Infektion seltener **immunologische Reaktion Typ 2** → Freisetzung von **Interleukin 4 und 5** aus Th2-Zellen. Bei ca. 10% der Betroffenen ist dieser Reaktionstyp genetisch determiniert.

**Wirkungen von Interleukin 4 und Interleukin 5:**

- Stimuliert Aktivität von B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen → Synthese und Freisetzung Borrelien-spezifischer Antikörper

- Drosselt Vermehrung und Aktivität der Makrophagen




Bewaffnete T-Helferzellen stimulieren erst die Proliferation und dann die Differenzierung antigenbindender B-Zellen.

Janeway, Ch. / Immunologie

Folge:

Makrophagen phagozytieren zwar Borrelien, verdauen sie aber nicht, da notwendiger Stimulus durch IFN-γ ausbleibt (keine Verschmelzung des Phagosoms mit einem Lysosom).

Kann infizierter Makrophage die Borrelie nicht verdauen, exprimiert er an seiner Oberfläche das **Fas-Antigen**.

Th1-Zellen und zytotoxische T-Lymphozyten erkennen diese Markierung und zerstören Makrophagen mit Borrelie.

Wenn zytotoxische T-Lymphozyten ihre Funktion erfüllen, ist bei immunologischer Reaktion Typ 2 die Infektion limitiert. Durch Suppression der Makrophagen-Aktivität werden weniger Stickoxid-Radikale freigesetzt.
Die Infektion verläuft klinisch stumm oder weniger schmerzhaft als bei immunologischer Reaktion Typ 1.

Wenn weder Makrophagen noch zytotoxische T-Lymphozyten ihre Funktion erfüllen, können Borrelien innerhalb der Makrophagen überleben und wieder virulent werden.
Die Borreliose wird chronisch.

Borrelien - intrazellulär in Wirtszellen - werden weder von Antikörpern noch von Ceftriaxon erreicht. Keine Passage der Zellmembran möglich.

Doxycyclin kann vermutlich wegen seiner hohen Plasmaeiweißbindung von 96% die Membran der Wirtszellen nicht überwinden.

**Fazit:**

Abhängigkeit einer erfolgreichen Eliminierung der Borrelien von der Funktion der Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen.

Antibiotika können unterstützen, entscheidend ist jedoch Funktionsfähigkeit des Immunsystems.

# Nachweisverfahren

Borreliose kann nur anhand klinischer Symptome diagnostiziert werden.

<u>Problem:</u>
unspezifische Symptome, z. B. Kopfschmerzen, Arthralgien, Parästhesien

# Nachweis Borrelien-spezifischer Antikörper

1) **ELISA**: „Suchtest“, erkennt Antikörper gegen hoch- und unspezifische Borrelien-Antigene

<u>Probleme</u>:

- Kreuzreaktionen gegen ubiquitäre Hitze-schockproteine, z. B.
  - Herpes simplex-Virus
  - Toxoplasma gondii
  - Candida albicans

- starke immunologische Reaktion vom Typ 1
  - Suppression der B-Lymphozyten und Plasmazellen
- persistierendes Borrelien-spezifisches IgM
- polyklonale IgM-Stimulation
  - durch anderen Erreger
- negatives IgM bei akuter Borreliose
  - besonders in den Stadien II und III
- Ausfall der Serokonversion
  - bei frühzeitig einsetzender Therapie

2) **Immunoblot (Westernblot)**: Bestätigungstest differenziert zwischen Antikörpern gegen hoch- und gegen unspezifische Antigene. Falsch positive Ergebnisse durch Kreuzreaktionen ausgeschlossen.

**Fazit:**

Ein positiver Antikörper-Nachweis im Immunoblot beweist keine floride Infektion und keine Borreliose.

Weder ein positives IgM noch ein Anstieg des IgG- bzw. IgM-Titers beweist eine akute Borreliose.

Ein negativer Antikörperbefund schließt die Borreliose nicht aus.

**Serologische Untersuchung** hilfreich unter folgenden Bedingungen:

1. Bei Verdacht auf Frühphase einer Primärinfektion Serokonversion des IgG

2. Typische Konstellation bei Neuroborreliose: in Liquor/Serum-Paar
   - erhöhter Borrelien-spezifischer Antikörperindex
   - nachweisbare Blut-Liquor-Schrankenstörung
   - intrathekale Immunglobulinsynthese
   - Pleozytose im Liquor

## 3) Schrankenstörung, intrathekale Immunglobulinsynthese und Antikörperindex

- Untersucht wird Liquor/Serum-Paar, d.h. Liquor und Serum - Entnahme am selben Tag

- Gemessen werden Albumin, Gesamt-IgG, Gesamt-IgM, Gesamt-IgA und Borrelien-spezifisches IgG

- Aus Liquor- und korrespondierenden Serumwerten Quotienten bilden

# Nachweis der Schrankenstörung

$$Q_{Alb} > 5 \times 10^{-3} \quad (bis\ 15\ Jahre)$$

$$Q_{Alb} > 6,5 \times 10^{-3} \quad (bis\ 40\ Jahre)$$

$$Q_{Alb} > 8 \times 10^{-3} \quad (bis\ 60\ Jahre)$$

$$Q_{Alb} > \left(4 + \frac{ALTER}{15}\right) \times 10^{-3}$$

# Nachweis intrathekale Immunglobulinsynthese

$$Q_{Lim}(IgG) = 0,93\sqrt{\left(Q_{Alb}\right)^2 + 6 \times 10^{-6}} - 1,7 \times 10^{-3}$$

$$Q_{Lim}(IgA) = 0,77\sqrt{\left(Q_{Alb}\right)^2 + 23 \times 10^{-6}} - 3,1 \times 10^{-3}$$

$$Q_{Lim}(IgM) = 0,67\sqrt{\left(Q_{Alb}\right)^2 + 120 \times 10^{-6}} - 7,1 \times 10^{-3}$$

Intrathekale IG - Fraktion

Cut off IgG/IgM/IgA (IF) > 10%

$$IgG_{IF} = \left(Q_{IgG} - Q_{Lim}\right) \times 100$$

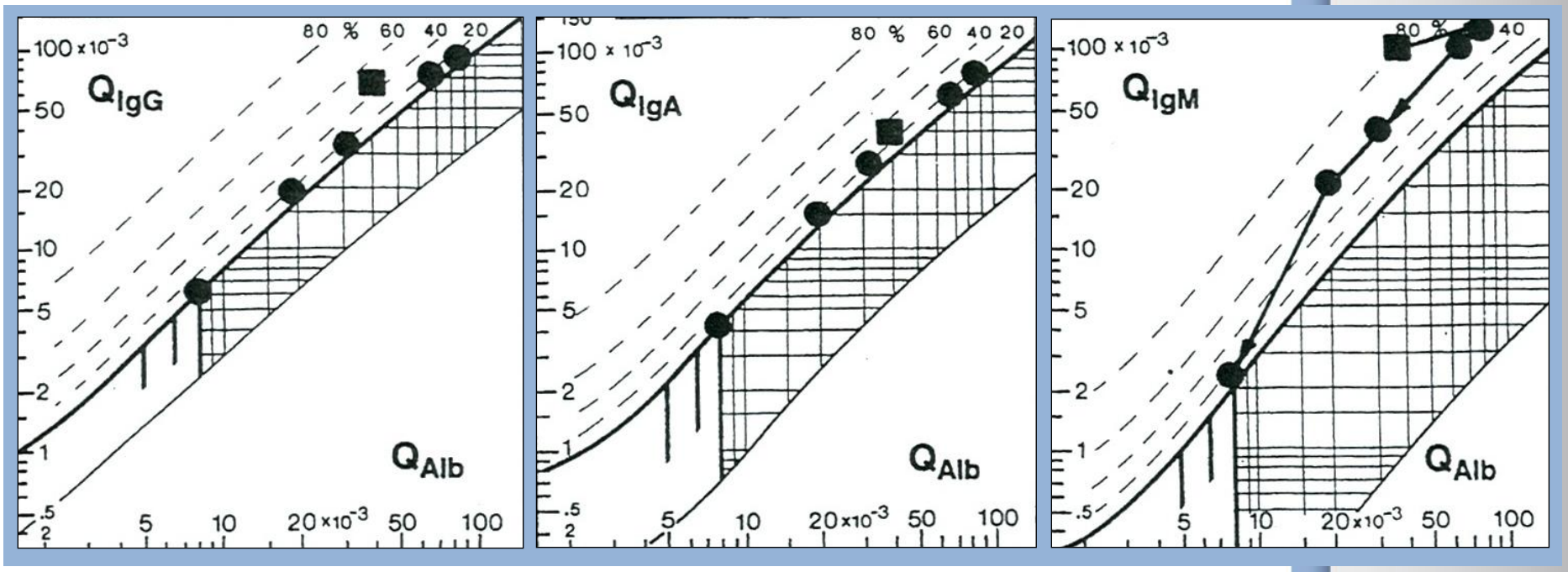
**Bewertung**

der intrathekalen Immunglobulinfraktionen in **Quotientendiagrammen**:

gemessene Albuminquotienten und Immunglobulin-quotienten sind abgebildet und zu Q(Limes) in Beziehung gesetzt.

Problem:
nicht in den aktuellen Leitlinien für Neuroborreliose

# Zeitverlauf der Liquorproteindaten eines Patienten mit Neuroborreliose




Reiber, H. / Lab. Med.

# Nachweis des Borrelien-spezifischen Antikörperindex

$$AI = \frac{Q_{spez}}{Q_{IgG}} \left( \text{für } Q_{IgG} < Q_{Lim} \right) \quad \text{oder} \quad AI = \frac{Q_{spez}}{Q_{\lim} \; (IgG)} \left( \text{für } Q_{IgG} > Q_{Lim} \right)$$

Nachweis eines Borrelien-spezifischen Antikörper-index (AI) nach 2-8 Wochen

Ein erhöhter Borrelien-spezifischer Antikörperindex ohne Pleozytose und ohne Schrankenstörung ist vereinbar mit einer abgelaufenen Neuroborreliose.

<u>Problem:</u>
Unterdrückung der Antikörperbildung bei immunologischer Reaktion vom Typ 1 → Berechnung des Borrelien-spezifischen Antikörper-Index nicht möglich

# Nachweis der zellulären Immunreaktion

1) **Lymphozytentransformationstest (LTT) auf Borrelien-Antigene**

Messung der Lymphozyten-Vermehrung in Zell-kulturen:

- je Antigen eine Zellkultur
- eine Zellkultur mit Borrelien-Ultrasonikat („Mischantigen“)
- möglichst mehrere Zellkulturen jeweils mit einem rekombinanten Antigen
- eine Kontrollkultur ohne Antigen

Der <u>Stimulationsindex</u> (Ergebnis) ist Quotient zwischen Counts im Antigen- und im Kontrollansatz

Interpretation der Ergebnisse:

- **Stimulationsindex erhöht:** T-Effektorzellen vorhanden → Hinweis auf Borrelien-Infektion

- **Stimulationsindex unauffällig**: Naive Zellen vorhanden → kein Hinweis auf Borrelien-Infektion

- **Stimulationsindex grenzwertig**: Gedächtnis-zellen vorhanden → Hinweis auf zurück-liegende Borrelien-Infektion (DD: Frühphase einer Infektion)

➔ Mit dem LTT wird Borrelien-Infektion nachgewiesen bzw. ausgeschlossen. Bei negativem oder grenzwertigem Stimulationsindex Kontrolle 3-4 Wochen nach der ersten Blutentnahme erforderlich.

Aber: 95% der Infizierten sind beschwerdefrei (klinisch stumme Infektion), nur 5% erwerben klinisch manifeste Borreliose.

(Quelle: *Oschmann, Kraiczy et al. aus einer interdisziplinären Arbeitsgruppe der Universitätskliniken Frankfurt und Gießen*)

➔ Der LTT weist die Borrelien-Infektion nach, aber nicht die Krankheit Borreliose.

➔ Der LTT dient dem <u>Ausschluss</u> der Borrelien-Infektion und damit dem <u>Ausschluss</u> der Krankheit Borreliose.

**Indikationen für den LTT**:

1) Ausschluss einer Borreliose
   wenn zum Zeitpunkt der Blutentnahme die Beschwerden seit mindestens 4 Wochen bestehen (Anamnese).

2) Kontrolle des Therapie-Erfolgs
   8-10 Wochen nach Ende der Therapie
   (Cave: Herxheimer Reaktion bei zu frühzeitiger Blutentnahme).

Für den LTT keine Evidenz der Evidenzstufe 1A.

Keine Kassenleistung

# Studien

- **Neuartiger Lymphozyten-Transformations-Test (LTT-MELISA®) zum Nachweis einer Lyme-Borreliose / A novel lymphocyte transformation test (LTT-MELISA®) for Lyme borreliosis**
  *E. Valentine-Thon, K.Ilsemann, M. Sandkamp*
  LaboratoriumsMedizin 2008, Band 32, Heft 1, Seiten 26–34

- **Seronegative Lyme disease. Dissociation of specific T- and B-lymphocyte responses to Borrelia burgdorferi**
  *RJ Dattwyler, DJ Volkman, BJ Luft, JJ Halperin, J Thomas, MG Golightly*
  The New England Journal of Medicine, 1988; 319 (22):1441-1446

- **Lymphocytenproliferationstest bei kutanen Manifestationen der Lyme-Borreliose**
  *F. Breier, H. Klade, G. Stanek*
  WMW 7/8/1995 – Themenheft:“Lyme-Borreliose“

- **CFS und chronische Infektionen: Borreliose**
  *R. von Baehr, V von Baehr*
  CFS-FORUM: Einblicke in die Forschung; 2003; Heft 16/17

## 2) ELISPOT auf Borrelien-Antigene

Wie LTT, jedoch anderes Detektionsverfahren nach Lymphozytenproliferation:

**Im LTT** Nachweis der Proliferation durch Einbau radioaktiv markierten Thymidins in die Zellkerne der Lymphozyten
→ Messung der Radioaktivität

**Im ELISPOT** quantitative Bestimmung von Zytokinen, die nach Proliferation von den Effektorzellen freigesetzt wurden.

# Direkte Nachweisverfahren in der Routine

- PCR im Gelenkspunktat
- PCR im Liquor

<u>Probleme:</u>
häufig falsch negativ wegen geringer Sensitivität,

gelegentlich falsch positiv wegen verbliebener DNS-Fragmente nach kürzlich abgelaufener Infektion.

# Resümee

Die Borreliose ist eine klinische Diagnose und keine Labordiagnose.

Für Diagnose hilfreich:

1) in **Frühphase** der Krankheit die Serokonversion des IgG
2) bei **Verdacht** auf Neuroborreliose der Nachweis von Schrankenstörung, intrathekaler Immunglobulinfraktion (3-Klassen-Reaktion mit IgM-Dominanz) und erhöhtem Antikörperindex (Liquor/Serum-Paar vom selben Tag)
3) zum **Ausschluss** einer Borreliose bzw. zur Kontrolle des Therapieerfolgs negative bzw. grenzwertige Stimulationsindices im LTT (Kontrolle 8-10 Wochen nach Beendigung der Therapie)
4) ggf. der positive Nachweis von Borrelien-DNS im Gelenks-punktat bzw. im Liquor

# Borreliose -

## Immunreaktionen und Labordiagnostik

# Wir danken

# für Ihre Aufmerksamkeit

**Dr. med. univ. Kurt Kraus**

**MVZ** Laborzentrum Ettlingen GmbH
Otto-Hahn-Straße18 • 76275 Ettlingen