

Nachweis einer zellulären Sensibilisierung zur Diagnostik der aktiven Lyme-Borreliose, insbesondere Neuroborreliose



Dr. med.

Andreas Gerritzen

Facharzt für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie
Facharzt für Labormedizin

Medizinisches Labor Bremen

Medizinisches Labor Bremen

Haferwende 12 • 28357 Bremen • Fon (0421) 2072-0 • www.mlhb.de

Medizinisches Labor
Bremen



Die Lyme-Borreliose

- Silvatische Anthropozoonose
- Übertragung: durch Zeckenstich (*I. ricinus*)
- Erreger: *Borrelia burgdorferi sensu lato*
- Krankheit: Systemerkrankung in drei Phasen
- Lokalinfektion – frühe Generalisation – Chronifizierung
- Organmanifestationen: Haut, Nervensystem, Gelenke/BG, Herz u.v.a.m.

Der klassische Fall

- Z. n. Zeckenstich
- Nach einigen Tagen ringförmiges Erythem
- Leichtes Fieber, Abgeschlagenheit, „Grippegefühl“
- Fazialisparese
- Borrelienserologie: negativ
- Liquorbefund: geringe Pleozytose, überwiegend Lymphozyten, Schrankenstörung
- Diagnose: akute Neuroborreliose; sofortige antibiotische Therapie

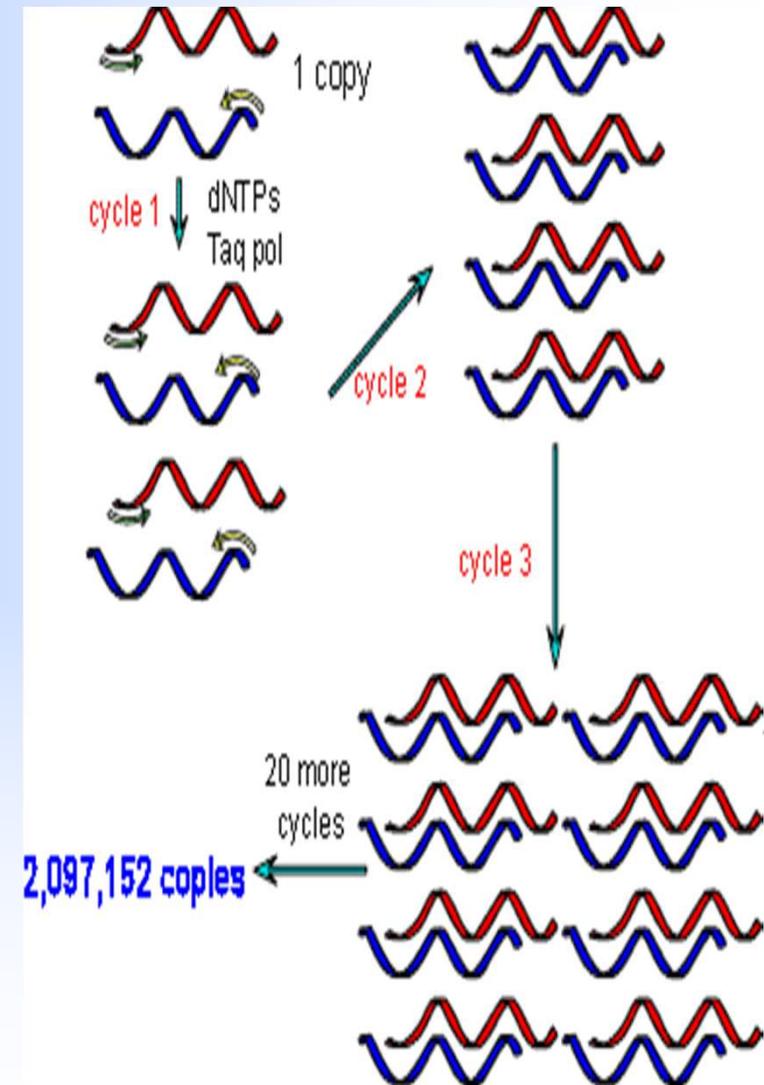


Der schwierige Fall

- Keine Zecken- oder E.m.-anamnese
- seit 1 Jahr Parästhesien und Schmerzen in den Beinen
- persistierendes Fatigue-Gefühl, Abgeschlagenheit
- Borrelienserologie positiv, jedoch uncharakteristisch

Die klassische Borrelien-Diagnostik

- Antikörpersuchtest (IgG und IgM), z. B. EIA, IFT, Agglutination
- Ergänzung und Bestätigung durch Immunoblot
- PCR (Kultur) aus Liquor, Punktat, Biopsie
- möglich auch aus Zecken, nicht sinnvoll in Blut und Urin



Einschränkungen der klassischen Diagnostik

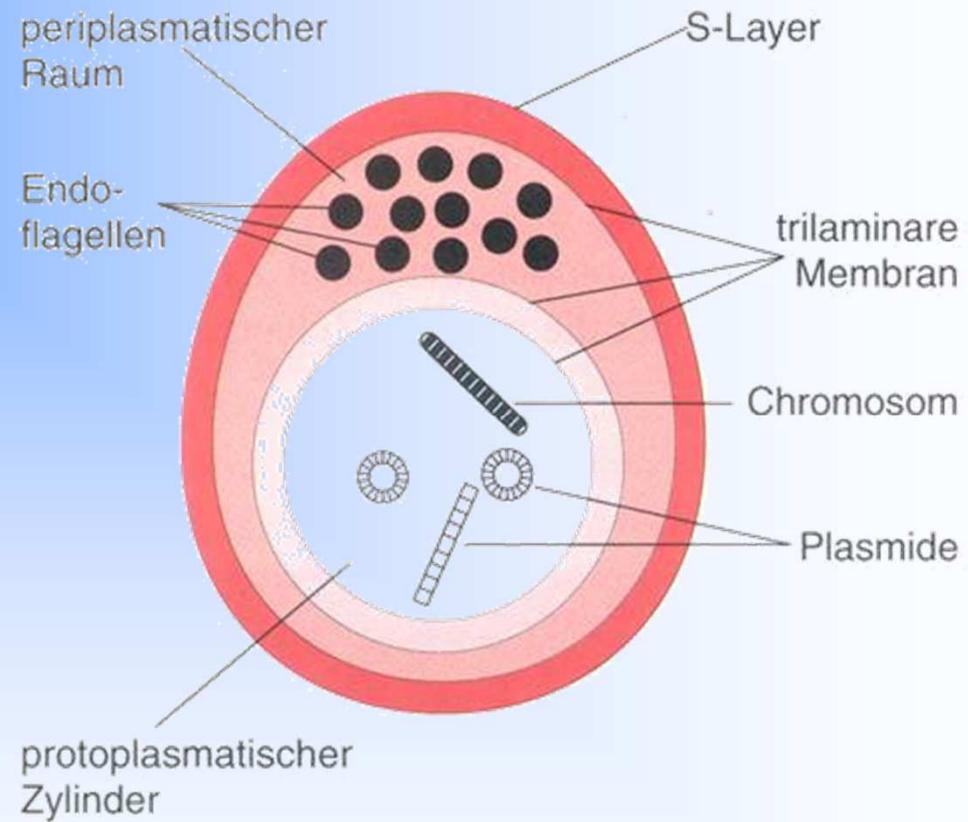
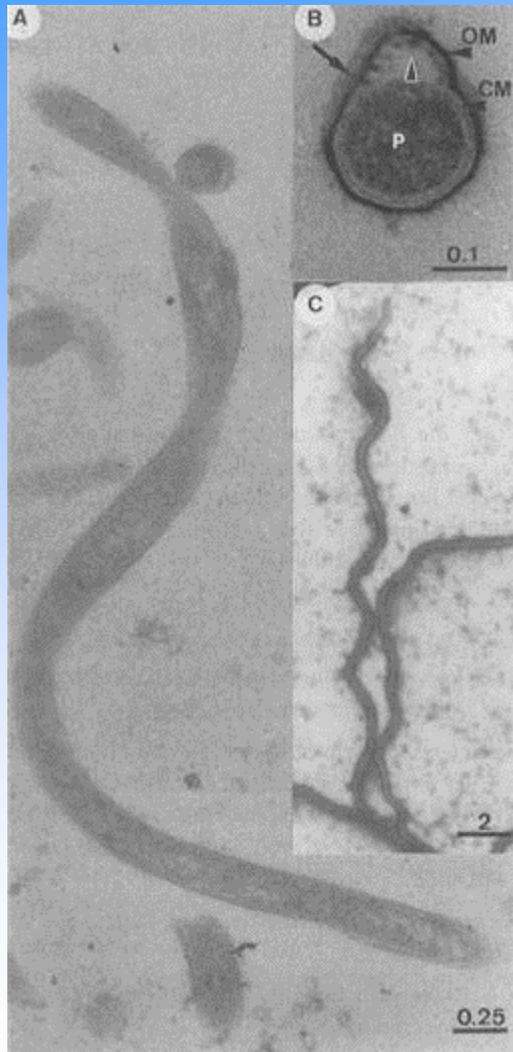
- Antikörper bei Frischinfektion oft noch negativ
- Serologie bleibt nach Ausheilung lange positiv
- Zur Therapiekontrolle praktisch ungeeignet
- Viele Menschen zeigen uncharakteristische Serobefunde
- Kultur sehr aufwändig und insensitiv
- auch PCR nur in seltenen Fällen positiv
- Ergänzung durch Einbezug der zellulären Immunität

Ablauf des Lymphozytentransformationstests

- Gewinnung von 10 – 20 ml CPDA-Blut
- Isolierung der mononukleären Zellen (buffy coat)
- Aufreinigung, Einstellen der Zelldichte
- in-vitro-Kultur im Dreifachansatz mit
 - negativer Kontrolle
 - positiver Kontrolle (PWM)
- - Auswahl von geeigneten rekombinanten Borrelienantigenen
- Zugabe von ^3H -markiertem Thymidin
- Zellernte, Messung der inkorporierten Radioaktivität
- Berechnung des Stimulationsindex (Verum/Negativkontrolle)



Aufbau von *Borrelia burgdorferi*



Proteine von *Borrelia burgdorferi*



Proteine von *B. burgdorferi* s.l.

Protein- bezeichnung	Molekulargewicht (kDa)	Genetische Lokalisation	Diagnostischer Nutzen	Stadiumabhängige Markerqualität	Bemerkung	Literatur
p33/100	80 / 100	Chromosomal	+++	Spätphase		07,096,00,09626
P70	70	Chromosomal	Nein		Plasmidogen bindendes Protein	074
HSP70	70	Chromosomal	Nein		Heat-shock protein	007,007
Oms66	66	Chromosomal	+	Spätphase		00,076
ErpB5/O*	60	Lineares Plasmid	Nein			07,209,094
HSP60	60	Chromosomal	Nein		Heat-shock protein, Kreuzreaktivität mit > 60 Bakterien	007,007
p58	58		+++	Spätphase		02,075,020,030
BBK50			Nein			000
BBK52	47		++	Frühphase	Fibrinrezeptor- protein, Expression nur in vivo, Speziespezifisch	000,000,004
FlaB	41	Chromosomal	+	Früh-/Spätphase	Kreuzreaktionen	02,290,079
p40	40	Chromosomal	?		Flagellinprotein	000
BmpA	39	Chromosomal	+++	Spätphase	Speziespezifität	00,090,00,075
FlaA	37	Chromosomal	+	Früh-/Spätphase	Kreuzreaktionen, RF	00,020,00,000
BmpD	37	Chromosomal	?	Spätphase		07,005,007
OspB	34 - 36	Lineares Plasmid	Nein			02,075,020,030, 074,020
vlsE (IR6)	35	Lineares Plasmid	++	Früh-/Spätphase		02,075,020,030, 200,020,000,000
p35	35	Chromosomal	++	Frühphase		7,000,007,000,070,000
OspA	31 - 33	Lineares Plasmid	+++	Spätphase		00,000,000,000
p30	30	Chromosomal	++			70,020,000,000
OspD	28	Lineares Plasmid	Nein			07,207
p27	27	Lineares Plasmid	Nein			007
OspF* (BBK2.10, BBK2.11)	26	Zirkuläres Plasmid	+	Früh-/Spätphase		0200,200
OspC	21 - 24	Zirkuläres Plasmid	+++	Früh-/Spätphase	Speziespezifität, Kreuzreaktivität, RF	07,000,000,000, 200,000,000,000

DbpA	22		+	Spätphase	Speziespezifität Kreuzreaktivität, RF	05,037,030,030,200,000
pg22 / IpLA7	22	Lineares Plasmid	Nein		In vivo Expression	030,220,030,000
p21*	21	Lineares Plasmid	Nein		In vivo Expression	75,030,030,000
ErpA/I/N*	19	Lineares Plasmid	Nein			027,200,000
OspE*	19	Zirkuläres Plasmid	++	Früh-/Spätphase		222,200,200
EppA	18	Zirkuläres Plasmid	Nein		Inneres Membranprotein	000,200
Osp17, p18	17	Lineares Plasmid	+++	Spätphase		075,000,000,000,000
Elps A, B*	?	Zirkuläres Plasmid	+	?	Mögliche Aktivitätsmarker	00,000-000

Diagnostischer Nutzen bestätigt durch

- +++ zahlreiche Studien
- ++ mehrere Studien
- + einzelne Studien

bmpA = Borrelia membrane protein A

dbpA = decorin binding protein A

Elps = OspE/F-like leader peptides

EPPA = exported plasmid protein A

Erp = OspEF-related protein

Fla = Flagellin

HSP = heat shock protein

oms = outer membrane-spanning

Osp = Outer surface protein

IR6 = immunodominant conserved region (synthetische C6-Peptid)

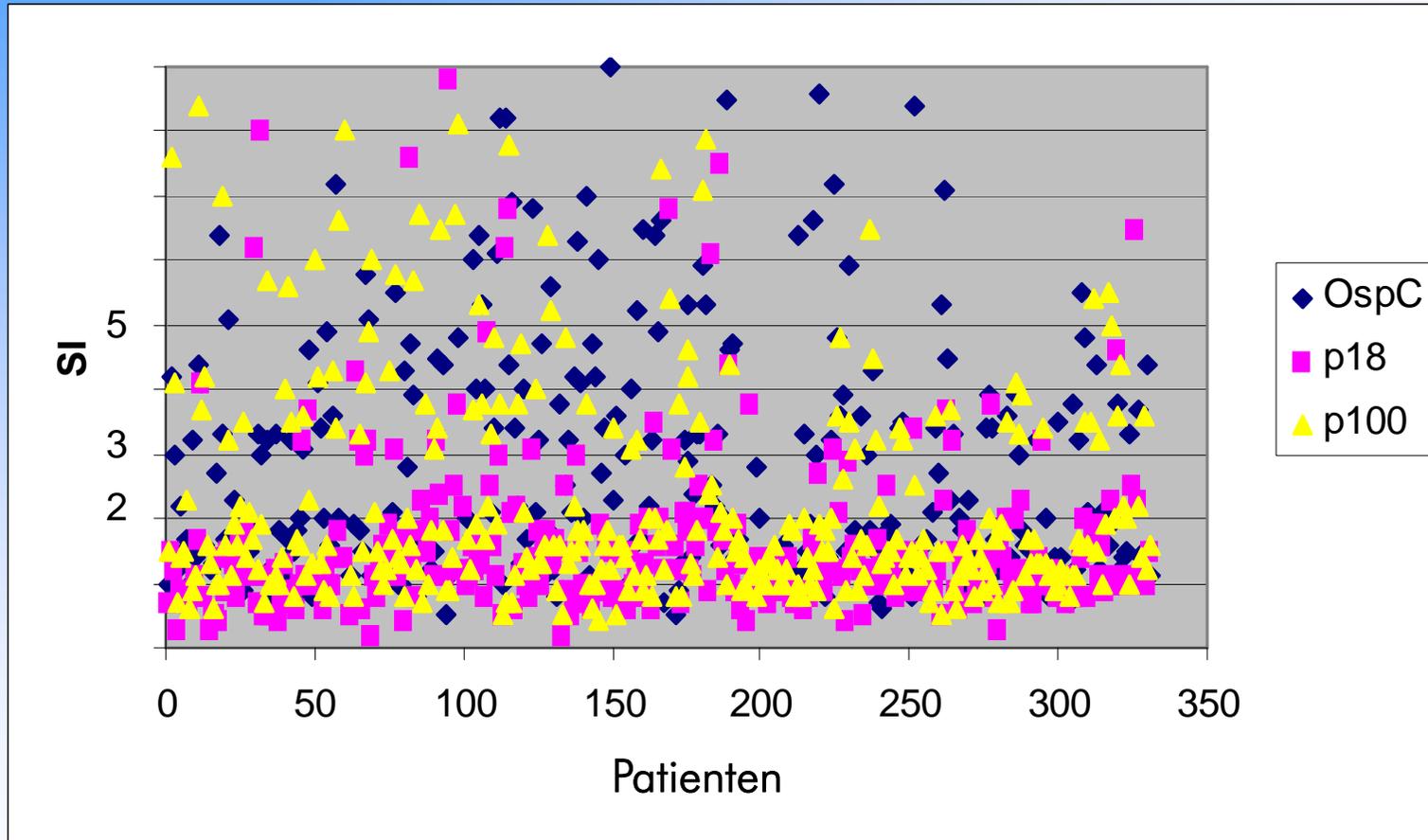
vls = vmp-like Sequences (Vmp = variable major proteins)

* = Vertreter der "Erp-Familie"

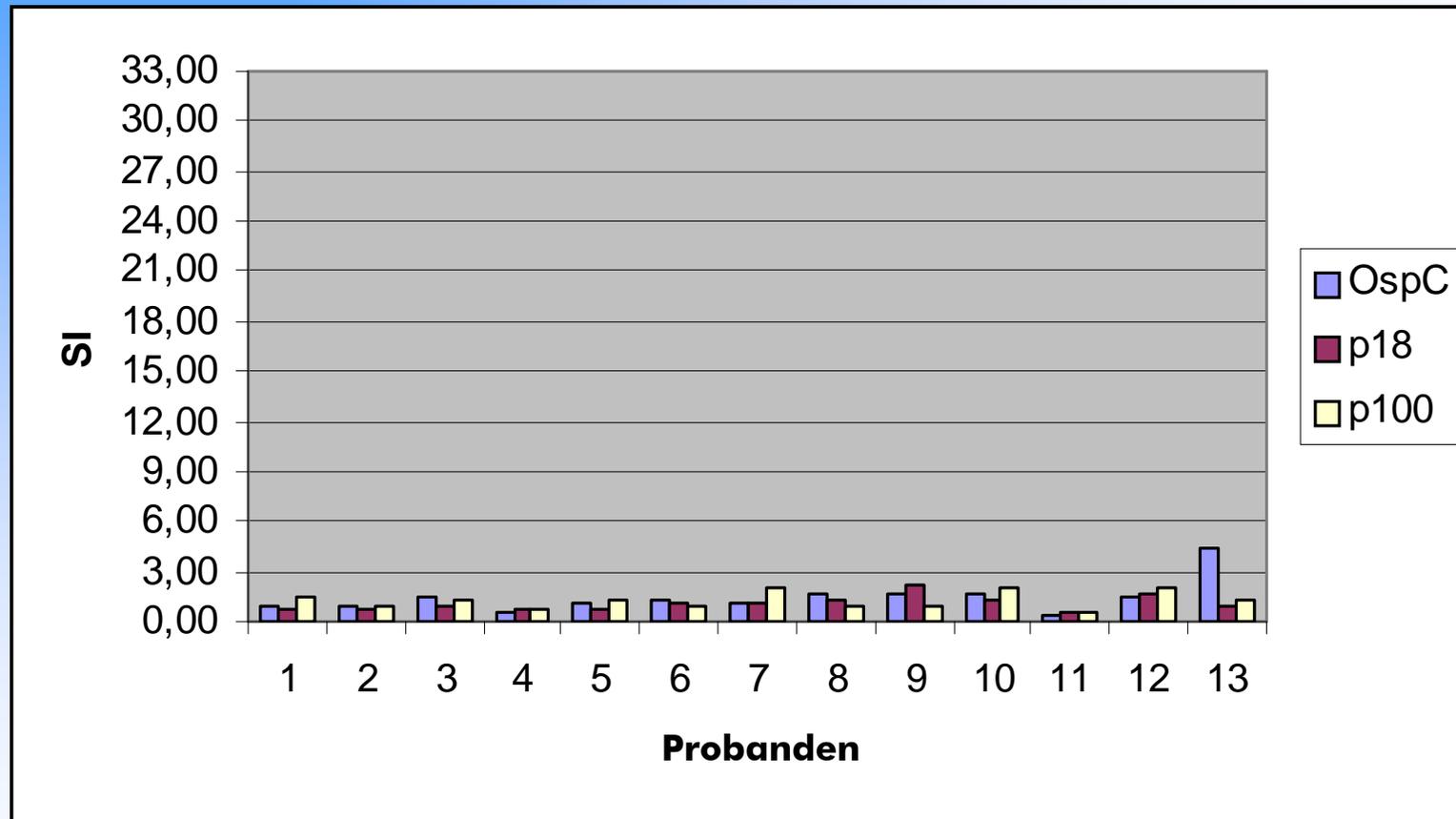
Auswahl der Proteine für den LTT

- Hochspezifisch, nicht kreuzreaktiv, hochreine Darbietung
- Vermeidung unspezifisch stimulierender Antigene (LPS)
- repräsentativ für alle relevanten Subspecies
- repräsentativ für alle Infektionsphasen
- OspC (3-fach-Gemisch), p100, p18

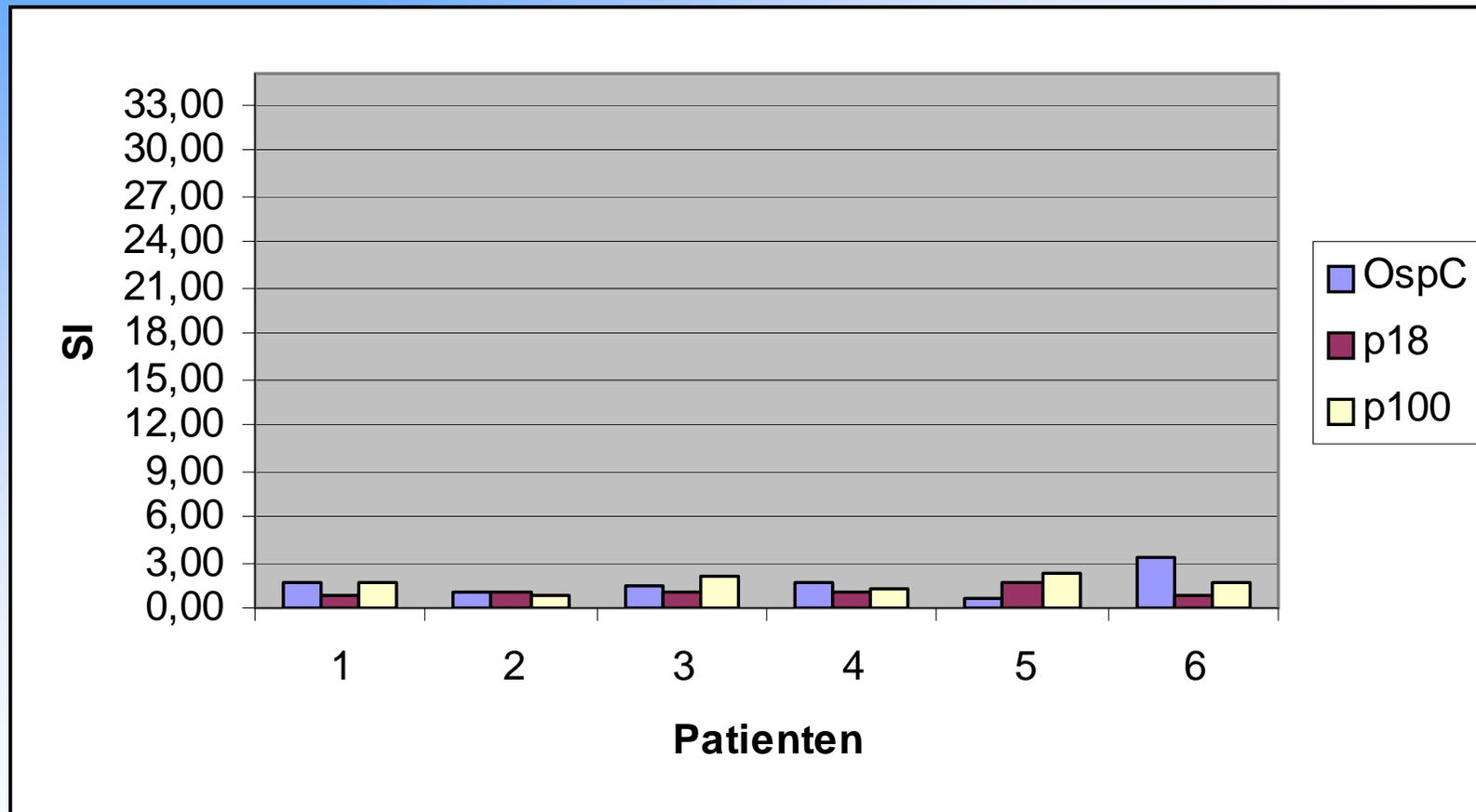
LTT-Ergebnisse (Summe)



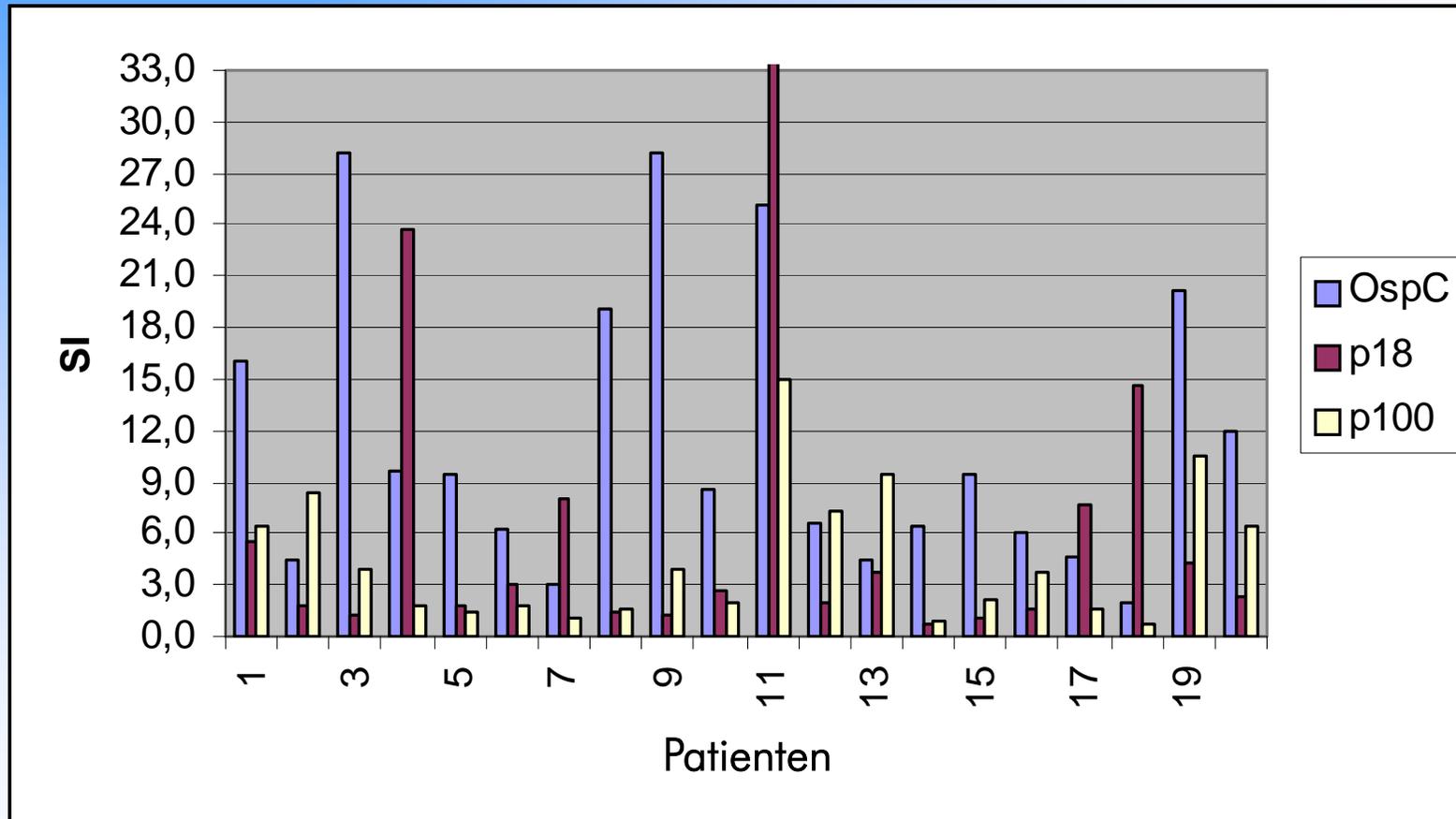
LTT bei seronegativen Probanden



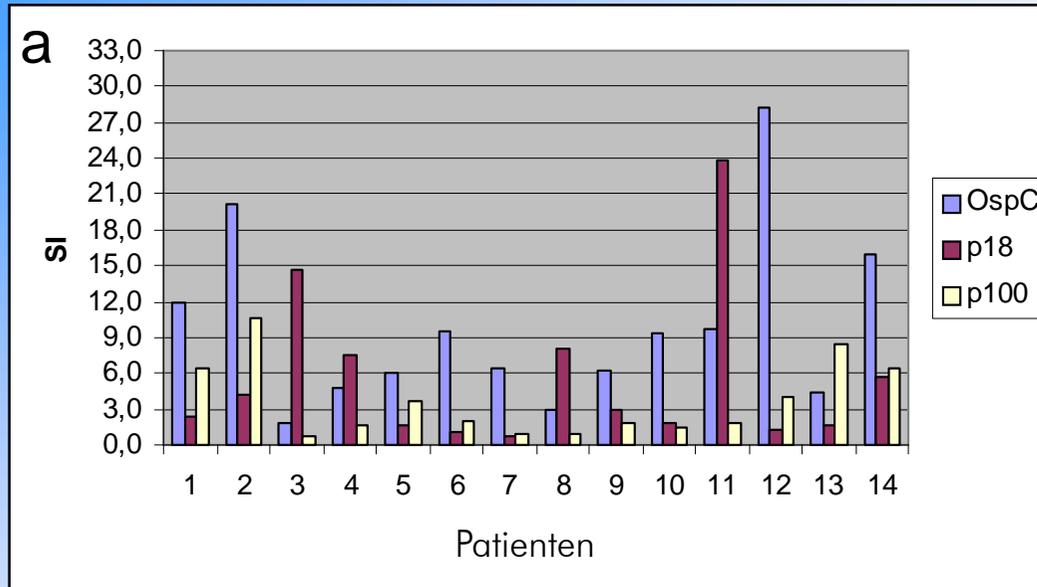
LTT bei seropositiven klinisch unauffälligen Patienten



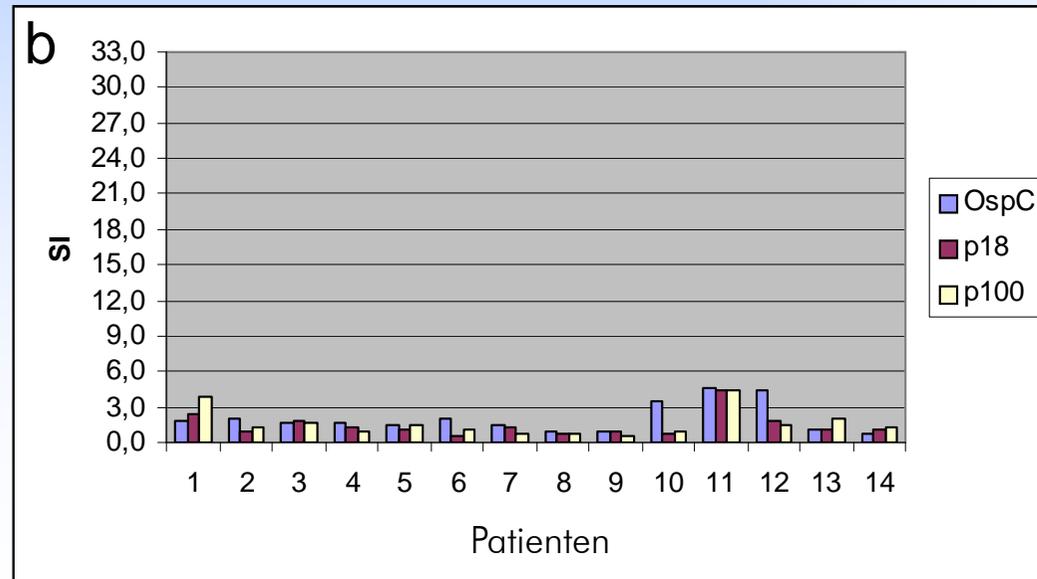
LTT bei seropositiven symptomatischen Patienten



LTT vor/nach Therapie

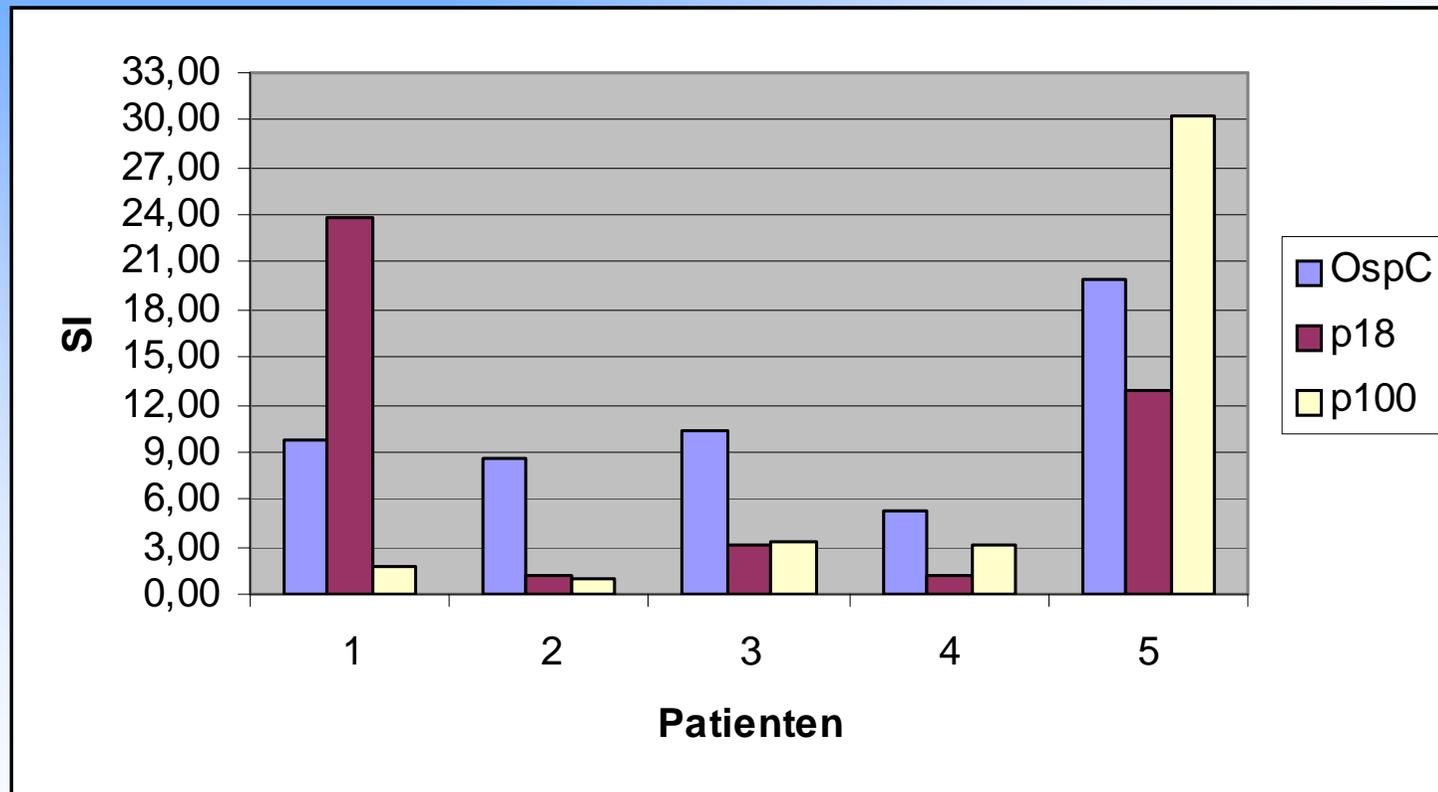


vor Therapie



nach Therapie

LTT bei seronegative Patienten



Patienten mit Borreliose-verdächtigen Symptomen

Befundbeispiele Neuroborreliose I

- B.P., männlich, 51 Jahre alt
- März 2003 E.m. nach Zeckenstich, 10 Tage Doxy
- Sommer 2003 Taubheit der Beine, rheumatologische Symptomatik
- auffällige Borrelienserologie, IgG und IgM positiv
- LTT hochpositiv (OspC 20.2, p100 10.6, p18 4.3)
- nach drei Wochen Rocephin klinisch geheilt
- 6 Wochen später Serologie unverändert, LTT normalisiert (2.0, 1.3, 1.0)

Befundbeispiele Neuroborreliose II

- S.M., weiblich, 63 Jahre alt
- Oktober 2003 E.m., 10 Tage Doxy
- seit Dezember 2003 zunehmende Taubheit der Beine
- Im Liquor Oligoklonale IgG schwach positiv (4 Banden)
- Borrelien-IgG-AI negativ, IgM-AI 20.4
- Borrelien-LTT positiv
- nach 14 Tagen Rocephin i.v. klinisch deutlich gebessert
- Serologie nach 1 1/2 Jahren rückläufig
- keine Kontrolle von Liquorbefund und LTT erfolgt

Befundbeispiele Neuroborreliose III

- S.V., weiblich, 27 Jahre alt
- seit 1 Jahr Facialisparese und Parästhesien im Mundbereich
- Abgeschlagenheit, bislang kein Arztbesuch
- Borrelienserologie negativ
- Borrelien-LTT positiv (OspC 9.7, p100 1.8, p18 23.8)
- nach 25 Tg. Rocephin i.v. Parese normalisiert
- deutliche Besserung des Allgemeinbefindens
- Parästhesien gebessert, aber nicht beseitigt
- LTT bereits nach 2 Wochen deutlich rückläufig
- bis heute negative Borrelien-Serologie

Fazit Borrelien-LTT

- Kontrollierte Bedingungen mit geeigneten Antigenen
- Ergänzung bei unklarer Serologie
- Therapiekontrolle
- Bewertung immer unter Würdigung des Gesamtbefundes



**Vielen Dank für Ihre
Aufmerksamkeit!**

