

- THERAPIE
- GESUNDHEITS-
POLITIK
- ARZT +
PATIENT
- PRÄVENTION

SCHWERPUNKTTHEMA

Diagnostik heute

MIT FACHBEITRÄGEN DER DEUTSCHEN BORRELIOSE GESELLSCHAFT E.V.

- Situations-
gerechte
Labordiagnostik
- Symptome

- Rekombinante
Antigene
- Neuro-
borreliose

- Schmerzen
verlernen
- Prominente
(Opfer)

Verbesserte Borrelien-Serologie

durch Einsatz von rekombinanten Antigenen mit der Luminex-Technologie

Bereits seit vielen Jahren werden in führenden medizinischen Laboren die Vorteile von rekombinant hergestellten Antigenen bei der Durchführung der Borrelienserologie genutzt. Sowohl in den Suchtests (IgG- und IgM-EIA) als auch bei den Westernblots zur Bestätigungsdiagnostik (auch als IgG- und IgM-Immunoblot bezeichnet) gelangen dafür die hochspezifischen, immun-dominanten und reinen Borrelien-Antigene zum Einsatz, die ein Höchstmaß an diagnostischer Sensitivität und Aussagekraft mit einem Minimum an Kreuzreaktionen und Unspezifitäten verbinden.

Borrelien-Tests nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip

Doch woher kommen eigentlich diese Vorteile? Um dies richtig verstehen zu können, muss man sich zunächst klar machen, wie die Labortests eigentlich funktionieren. Bei der klassischen Labordiagnostik der Lyme-Borreliose wird im Blut betroffener Patienten nach Antikörpern gesucht. Dies sind lösliche Abwehrstoffe, die gegen den bakteriellen Erreger gerichtet sind und nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip des Immunsystems genau darauf abgestimmt sind. Will man im Labortest die Abwehrstoffe nachweisen, so muss man zunächst den Erreger kennen und für seinen Test verfügbar haben. Hierfür werden die Borrelien-Bakterien kulturell angezüchtet, dann abgetötet und in einem chemischen Prozess in ihre einzelnen Bestandteile (Antigene) zerlegt oder lysiert. Die so entstandene Bakterienpräparation wird dementsprechend auch als Vollantigen-Lysat bezeichnet. Diese Bestandteile werden dann in dem Test eingesetzt, um im Patientenblut enthaltene, dazu passende Abwehrstoffe heraus zu fangen und sichtbar zu machen.

Falsch positive Ergebnisse bei den Vollantigen-Verfahren

Es gibt allerdings viele und erhebliche Probleme bei dieser Vorgehensweise. Die Lysatpräparationen enthalten immer Verunreinigungen aus der vorhergehenden Bakterienkultur und bringen dadurch Fängerstoffe (Antigene) in den Test ein, die mit Borrelien gar nichts zu tun haben. Auch eigens eingeführte Reinigungsschritte können dies nicht ganz verhindern. Dies führt dann im Test zu irreführenden, falsch positiven Ergebnissen. Aber auch die echten Borrelienantigene

aus den Präparationen sind nicht alle für den Einsatz im Test geeignet. So enthalten die Borrelien beispielsweise neben anderen auch so genannte Geißelantigene. Diese werden auch als Flagellin oder nach ihrer molekularen Größe als p41 bezeichnet. Sie sind Bestandteile der Geißeln, mit deren Hilfe sich die Bakterien in Flüssigkeiten wie mit einem Propeller vorwärts bewegen können.

Dummerweise haben aber außer den Borrelien auch viele andere Bakterien dieses Flagellin zur Verfügung. Darunter sind auch solche, die beim Menschen sehr häufig zu mehr oder wenigen harmlosen Erkrankungen wie z. B. Harnwegsinfekten führen können. In der Folge einer solchen Infektion bildet der Mensch dann aber Antikörper gegen das Flagellin dieser Bakterien aus. Und wenn im Borrelientest ebenfalls Flagellin eingesetzt ist, führt das zwangsläufig zu falsch positiven, irreführenden Resultaten.

Auch falsch negative Ergebnisse im Vollantigentest möglich

Umgekehrt haben die Vollantigentests aber auch mit dem Nachteil zu kämpfen, dass sie natürlich nur die Antigene einsetzen können, die der zur Kultur benutzte Bakterien-Laborstamm auch zur Verfügung hat. Und diese Auswahl ist keineswegs immer repräsentativ für die Antigene der Bakterien, die im wirklichen Leben die Infektionen hervorrufen! Denn in der freien Wildbahn existieren meist viele, etwas unterschiedliche Stämme einer Bakterienart, die sich mehr oder weniger stark von ihrem Ursprung unterscheiden. Wird der Unterschied zu groß, resultieren daraus falsch negative Testergebnisse im Labortest: die gegen die veränderten Bakterien aus der Wildbahn gerichteten Antikörper im Patientenblut

von **Andreas Gerritzen**

reagieren dann nämlich nicht mehr ausreichend oder sogar überhaupt nicht mit den Antigenen des herkömmlichen Laborstamms!

Ein typisches Beispiel für ein Antigen, bei dem die beschriebenen Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen sehr ausgeprägt sein können, ist das OspC-Antigen. Es ist vor allem in der Frühphase der Immunreaktion, also bei Frischinfektionen wichtig. Auch gibt es Antigene, die bei den Laborstämmen gar nicht erst in ausreichender Menge vorhanden sind, sondern die man nur bei Wildstämmen direkt im lebenden Organismus findet. Man nennt diese Antigene deshalb auch in-vivo-Antigene. Das bekannteste Beispiel ist das für die Diagnostik immens wichtige VlsE-Antigen, das während der Infektion des Organismus fast immer eine starke Antikörperreaktion hervorruft, aber in den herkömmlichen Laborstämmen praktisch überhaupt nicht repräsentiert ist und deshalb zu keinem messbaren Testsignal führen kann.

Gezielte Auswahl von Antigenen: auf dem Weg zum Designertest

Die nahe liegende Lösung dieser Probleme der Vollantigentests wären nun natürlich Verfahren, die alle wichtigen und spezifischen Antigene aller relevanten Borrelien enthalten, die bei der Infektionsabwehr durch den Menschen eine Rolle spielen. Sie würden deshalb den Labortest bei der Untersuchung von Patientenblut zu Recht positiv reagieren lassen. Gleichzeitig müssten aber auch alle Verunreinigungen beseitigt werden, und diejenigen Antigene aus dem Test verbannt werden, die bekanntermaßen oft auch bei anderen Bakterien vorkommen und deshalb zu falsch positiven Ergebnissen bei der Untersuchung führen. Neudeutsch würde man bei einer solchen Vorgehensweise von einem Designertest sprechen. Der Test würde nicht mehr länger nur das nutzen, was schon natürlicherweise vorhanden ist, sondern in einem intelligenten Auswahl- und Kompositionsverfahren die Zutaten zu-

sammenfügen, die die optimale Ausbeute für den angestrebten Zweck bringen. Diese Vorgehensweise ist mit der herkömmlichen Bakterienantigenherstellung nicht durchführbar. Man kann zwar versuchen, Stämme zu mischen, Unspezifitäten zu vermeiden, Verunreinigungen nachträglich wieder zu beseitigen, aber alle diese Maßnahmen zeigen nur begrenzten Erfolg in der Praxis.

Genetisch programmierte Mikroben als Fabrik für rekombinante Antigene

Den Ausweg aus dieser Kluft zwischen Anspruch und Wirklichkeit bieten moderne molekularbiologische, gentechnologische Verfahren. Hat man nämlich einmal ein spezifisches, wichtiges Antigen identifiziert, kann man mit etwas Glück und Geschick auch das zugehörige Gen dazu, also die Erbsubstanz auf DNA-Basis finden und isolieren. Dieses Gen wird im Labor mit einem gezielten Verstärker gekoppelt und anschließend als „Turbo-Gen“ in geeignete Bakterien oder andere Zellen eingebracht. Diese kann man dann durch gezielte Kulturbedingungen dazu bringen, das gewünschte Antigen in großen Mengen und sehr hoher Reinheit zu produzieren. Die genetisch veränderten Zellen sind dann sozusagen Minifabriken zur gezielten Antigenherstellung im Dienste der Gesundheit geworden. Meist werden dafür E.coli-Bakterien benutzt, die sich sehr leicht und effizient umprogrammieren und kultivieren lassen, es gibt aber auch gut funktionierende Systeme z. B. auf der Basis von Hefepilzen oder von Zellen aus Insektenspeicheldrüsen. Der erwünschte und erreichte Effekt ist aber immer derselbe: eine hohe Ausbeute eines gezielt ausgesuchten und hochreinen Antigens, welches jetzt sozusagen nur noch geerntet werden muss. Und wenn mehrere Antigene erforderlich sind, kann man verschiedene umprogrammierte Fabriken gleichzeitig arbeiten lassen und anschließend die Ernte aus Einzelbausteinen ganz gezielt zusammensetzen. Man nennt die auf solche gentechnologische Weise hergestellten Antigene auch rekombinante Antigene.

Gekonnte Zusammensetzung bringt den gewünschten Erfolg

Durch eine gezielte Auswahl der am besten geeigneten, rekombinanten Antigene können die so komponierten Tests sehr

sensitiv und doch zugleich spezifisch ausgelegt werden. Voraussetzung ist natürlich intensive Forschungsarbeit, um die richtigen Zielantigene auch zweifelsfrei zu identifizieren. Ist dies aber erst einmal gelungen, wird die Aussagekraft der Laboruntersuchung gleichzeitig sowohl bei der akuten Borrelioseinfektion (z. B. Erythema migrans) als auch bei protrahierten und chronischen Verläufen (z. B. rheumatischer Formenkreis, Neuroborreliose, andere Organmanifestationen) stark verbessert.

Die Vorteile kommen besonders auch beim Einsatz der rekombinanten Tests in der Liquordiagnostik zum Tragen, wenn speziell die Neuroborreliosediagnostik angestrebt wird. Außerdem ermöglichen es die rekombinanten Substanzen, die unterschiedliche Ausprägung von Antigenen durch die verschiedenen, humanpathogenen Borrelienspezies (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. b. afzelii* und *B. b. garinii*; *B. spielmannii*) in einem einzigen Testansatz widerzuspiegeln, so dass Antikörper gegen alle vier Subspezies sicher erfasst werden. Es ist also durch die geeignete Auswahl rekombinanter Proteine sichergestellt, dass im Patientenblut vorhandene Borrelienantikörper sicher festgestellt werden können, unabhängig von der Borrelienunterart, die die Infektion hervorgerufen hat, und unabhängig vom Stadium der Erkrankung.

Aber auch für die rekombinanten Tests gilt natürlich: Wo keine Antikörper sind, können auch keine gefunden werden. Dies gilt bekanntlich in vielen Fällen von Frischinfektionen, wo die Erkrankung schon ausgebrochen ist, aber die Antikörper erst Wochen später nachweisbar werden.

Noch besser: rekombinante Antigene im Multiplextest

Die technische Durchführung der Antikörperbestimmungen wird typischerweise in einer klassischen Stufendiagnostik durchgeführt: Mit dem klassischen EIA-Suchtest wird geprüft, ob überhaupt IgG- oder IgM-Antikörper gegen Borrelien im Blut vorhanden sind, mit dem Westernblot (= Immunoblot) wird anschließend eine Spezifitätskontrolle und weitere Differenzierung vorgenommen. Erfahrene Anwender und Beurteiler dieser Tests wissen aber, dass mit dem Immunoblot gelegentlich auch bei negativem EIA-Suchtest Borrelienantikörper nachgewiesen werden können, weil der

Blot empfindlicher ist. Hierdurch wird natürlich der Sinn der Stufendiagnostik in Frage gestellt.

Neuerdings steht jetzt eine fortschrittliche immunologische Technologie zur Verfügung, die viele Vorteile bei der Borrelienserologie bietet, nämlich die Multiplex-Analytik mittels Luminex-Technologie. Auch im Luminex-System werden die oben geschilderten Vorteile der rekombinanten Antigene vollständig genutzt, aber nicht mehr in festphasengebundenen Mikrotiter-EIAs und mit antigenbeschichteten Westernblotstreifen, sondern mit einem Cocktail von Tausenden verschiedener, antigenträger winziger Kunststoffkügelchen, die in einer Trägerflüssigkeit suspendiert sind. Man nennt diese Kügelchen auf englisch auch „beads“. Jedes einzelne Kügelchen wird nur mit einem einzigen Borrelien-Antigen beschichtet, so dass die immunologische Reaktion zum Antikörpernach-



Dr. med. Andreas Gerritzen

weis völlig ungestört von den anderen Antigenen auf den anderen Beads stattfinden kann. Bis zu 100 verschiedene Antigene können auf diese Weise gleichzeitig in einem einzigen Testansatz eingesetzt werden. Wollte man dies im klassischen EIA nachmachen, würde das heillose Antigen durcheinander zu völlig unvorhersehbaren Kreuzreaktionen, Unspezifitäten und gegenseitiger Behinderung bei der Antigenbindung führen.

Überlegene Kapazitäten der Multiplex-Beads: immer noch Reserve frei

Aus dem breiten Spektrum der bekannten Borrelienantigene können mit dieser neuen Technologie die am besten geeigneten, rekombinanten Proteine vollständig in den Test eingefügt werden. Hierdurch ist gewährleistet, dass die am stärksten immundominant reagierenden Antigene aller Phasen einer Borrelieninfektion, also der akuten, mittleren und der Chronifizierungsphase der Lyme-Borreliose repräsentiert sind. Ebenso leicht ist es möglich, jederzeit neue Antigene zu dem bestehenden Test hinzu zu fügen, wenn neue Forschungsergebnisse Vorteile davon erkennen lassen. Darüber

hinaus ist es natürlich auch kein Problem, alle für den Menschen relevanten Borrelien-Subspecies wirklich vollständig abzubilden, weil sozusagen immer noch ein Bead frei ist, wenn es sich als erforderlich erweisen sollte.

Sehr hohe Bandbreite des Messsignals dank Chemolumineszenz

Als messbares Nachweissignal für die abgelaufene Immunreaktion des Borrelientests wird im Luminexsystem anders als beim klassischen EIA und Westernblot keine enzymatische Farbentwicklung mit ihrem eng begrenzten, linearen Messbereich genutzt, sondern ein licht-emittierendes Chemolumineszenzsignal. Die Messung erfolgt voll automatisiert mit einem speziell dafür konstruierten Gerät nach Art eines Durchflussszytometers.

Diese Technologie ist wesentlich sensitiver als die herkömmlichen Verfahren, sie kann also positive Reaktionen schon bei viel geringeren Konzentrationen von Antikörpern nachweisen. Dies ermöglicht es, bei Frischinfektionen mit beginnender Antikörperbildung früher eine positive Reaktion zu finden. Außerdem erlaubt die neue Methode auch eine genaue Quantifizierung, also die verlässliche, zahlenmäßig erfassbare Zuordnung der Antikörperkonzentration in U/ml über einen wesentlich breiteren Messbereich als die herkömmliche Farbreaktionen. Dadurch kann insgesamt ein sehr viel breiterer Bereich der Immunreaktion im Borrelientest zuverlässig, präzise und reproduzierbar in einem einzigen Ansatz erfasst werden, als es mit herkömmlichen Verfahren möglich ist. Bisher übliche Verdünnungsansätze am nächsten Tag sind auch bei hohen Antikörperkonzentrationen nicht erforderlich, die endgültigen Befunde können dadurch bereits am ersten Tag der Probenbearbeitung erstellt werden.

Aber nicht nur die Geschwindigkeit der Analytik steigt. Von Vorteil ist auch der große Messbereich des Verfahrens z.B. bei Verlaufskontrollen nach Therapie, da zu erwartende Titerabfälle jetzt zuverlässiger erfasst werden können als früher. ■

Der Autor ist Facharzt für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie
Facharzt für Labormedizin, Medizinisches Labor Bremen, www.mlhb.de

LIQUOR

Auszug aus dem Merkblatt „Klinische Liquordiagnostik“,
Borreliose SHG Heidenheim

Vergleich altes Wissen zu neuen Erkenntnissen

Alt: 1992

Beispiele aus (AA107)
„Klinische Neurologie“
P. Barlit,
VCH-Verlag, ISBN 3-527-15484-1

Beachten Sie bitte den Sprachgebrauch besonders bei den **Hervorhebungen**:

Diagnostik. **Entscheidende** diagnostische Maßnahme **ist** die Lumbalpunktion, welche den Befund einer lymphozytären Meningitis ergibt mit einer lymphomonozytären Pleozytose zwischen 20 und 300 Zellen und mäßiggraden Eiweißerhöhungen. Sowohl im Serum als auch im Liquor **lassen** sich spezifische Antikörper gegen die Ixodes-rizinus-Spirochäte **nachweisen**, so dass die Diagnose serologisch **abgesichert** werden kann. Während im Serum IgG-Antikörper von mehr als 1:200 für die Diagnose **beweisend** sind, ist ein Wert von mehr als 1:4 im Liquor als pathologisch **anzusehen**, wobei es entscheidend ist, mittels eines Quotienten den Nachweis der spezifischen IgG-Produktion im Liquorraum **zu erbringen**.

Bleibt eine spezifische Behandlung aus, klingen trotzdem die neurologischen Ausfallerscheinungen spontan über einen Zeitraum von zehn bis zwölf Wochen wieder ab. Die Schmerzen bleiben unbehandelt über ein bis zwei Monate bestehen.

Erklärung medizinischer Fachbegriffe:
Glossar auf Seite 13

Neu: 2005 (L198)

„Klinische Liquordiagnostik“
U. K. Zettl, R. Lehmitz, E. Mix,
Walter de Gruyter Verlag, 2. Auflage
ISBN 3-11-018169-X

„Stadium 1 und 2 gelten als Frühphase, Stadium 3 als Spätphase der Infektion. Neurologische Manifestationen sind für das 2. Stadium (Meningoradikulitis-Bannwarth) und das 3. Stadium (chronische Neuroborreliose) charakteristisch. Im Stadium 1 ist kaum mit pathologischen Liquorveränderungen zu rechnen. Im Stadium 2 **kann** sich die Neuroborreliose unter anderem als Meningoradikulitis, Meningitis oder Hirnnervenausfall, insbesondere Fazialisparese, mit auffälligen Liquorbefunden manifestieren. Enzephalitiden und Enzephalomyelitiden sind charakteristisch für das Stadium 3, auch hier **können** entsprechende Liquorveränderungen gefunden werden. Ein direkter Erregernachweis über Kultivierung **gelingt** im Liquor cerebrospinalis in der Regel **nur** bei 2 bis 5% der Patienten und ist **abhängig** vom Stadium der Erkrankung.

In der Frühphase der Erkrankung **können** in bis zu 10% der Fälle Borrelien nachgewiesen werden. Molekularbiologische Methoden (PCR) sind für die Erregerdiagnostik bei der Neuroborreliose bisher **nicht** in großem Umfang **routinewirksam** geworden. Insgesamt wird mit einer **Sensitivität** zum jetzigen Zeitpunkt **als zu gering** (30 – 40%) **eingeschätzt**, obwohl sie in Einzelberichten mit bis zu 80% angegeben wird.“

Neurologen verweigern sich vor Borreliose

Neurologen-Kongress – und niemand spricht von Borreliose. Auch 2007 sucht man den Begriff „Borreliose“ vergeblich im Programm mit über 500 Einzelveranstaltungen der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (DGPPN), die ihre Fortbildungsveranstaltung als „Kongress der Superlative“ bezeichnet.

Lediglich der Autor Joachim Flügel, Facharzt für Neurologie und Psychiatrie, Crailsheim, berichtete zum Thema Schlafapnoe darüber, dass es „in Einzelfällen Assoziationen mit einer liquordiagnostisch gesicherten Neuroborreliose (12%)“ gegeben habe. Auch er weiß anscheinend nicht, dass ein negativer Liquor eine Borreliose nicht ausschließt.