

Häufigkeit und mögliche klinische Relevanz von Koinfektionen mit Borrelien und Anaplasma phagocytophilum.

Kurzdarstellung

Die sichere Diagnose einer Borrelieninfektion stellt die Laboratoriumsmedizin trotz immer besser werdender Analyseverfahren weiterhin vor erhebliche Schwierigkeiten. Weitgehend etablierte Verfahren wie ELISA, Westernblot, Lymphozyten Transformationstest (LTT) und Polymerase Kettenreaktion hinterlassen oftmals eine diagnostische Grauzone oder zeichnen sich durch die Unfähigkeit aus eine verlässliche Verlaufsprognose zu erstellen. Ein relativ neues Verfahren, der sog. EliSpot (*Enzyme Linked Immuno Spot*) misst die Freisetzung von Zytokinen einzelner immunkompetenter T-Helfer-Zellen nach Stimulation mit Antigenen und hat in der TB-Diagnostik bereits erfolgreich in die Laboratoriumsmedizin Einzug gehalten und den TB-Hauttest inzwischen als Methode der Wahl weitgehend abgelöst.

Neben der extrem hohen Sensitivität der Methode ist ein weiterer Vorteil die Möglichkeit mehr als einen Infektions-Parameter gleichzeitig abzugreifen. Dies ist insofern für die erweiterte Borreliendiagnostik von Bedeutung, als das in jüngster Zeit mehr und mehr Fälle einer Koinfektion mit *Anaplasma phagocytophilum* (ehemals *Ehrlichia spec.*) beschrieben wurden und auch ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Koinfektionen und chronisch verlaufenden Borreliosen postuliert wurde.

Primäres Ziel der hier vorliegenden Studie war es zu überprüfen, ob mit der Methode EliSpot eine ähnlich zuverlässige und hochsensitive Diagnostik einer möglichen Borrelieninfektion gelingen kann, wie dies bereits in einer Vielzahl von Publikationen an einem Gesamtkollektiv von weit über 7.000 Patienten mit latenter oder aktiver Tuberkulose beschrieben wurde. Unter Ausnutzung des Multiparameter-Charakters der EliSpot-Methode versuchten wir in einem weiteren Ansatz zu klären, inwieweit eine mögliche Koinfektion mit *Anaplasma phagocytophilum* bei Borrelieninfektionen eine Rolle spielt.

Eingang in diese Studie fanden insgesamt 535 Probanden, wobei die Patientengruppe (n=513) aus einer rheumatologischen Praxis in Baden Württemberg und aus einer Laborpraxis in Bayern rekrutiert wurden. Die Kontrollgruppe (n=22) setzte sich aus Probanden ohne klinische Anzeichen einer Borreliose (meist Laborpersonal) und aus einer Stichprobe von

Blutspendern der Uniklinik Ulm zusammen. Tabelle 1 enthält nähere Details zu den untersuchten Probanden.

Herkunft der Probe	Beschreibung
Labor A (n=317)	Patienten mit schwerwiegenden Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis (u.a. klinisch gesicherte Lyme-Borreliose, Sjörgen Syndrom, Fibromyalgie Syndrom, Reaktive Arthritis u.a.) und teilweiser langer Krankengeschichte
Labor B (n= 196)	Patienten überwiegend mit Anfangsverdacht auf Borreliose
Normalbevölkerung (n=22)	Laborpersonal und Blutspender ohne klinische Anzeichen einer Borreliose.

Tabelle 1: Details der Probanden dieser Studie

Resultate:

Nachweis borrelienspezifischer T-Zellen im EliSpot

Von den 513 untersuchten Personen der Patientengruppe konnten in 188 (37%) Fällen mittels EliSpot eine antigenspezifische T-Zell Reaktion beobachtet werden. Die Gruppe der gesunden Probanden zeigte in 18% (4 von 22) eine positive Reaktion auf borrelienspezifisches Antigen. Unter Berücksichtigung der klinischen Diagnose Borreliose reagieren 102 von 182 (57%) der Patienten positiv im EliSpot. Alle Patienten die nachweislich (EM und/oder positive Serologie und/oder persönlicher Bericht) frisch mit Borrelien infiziert wurden, konnten im EliSpot positiv getestet werden.

	Labor A	Labor B	Normalbevölkerung
Anzahl Probanden	317	196	22
Positive Reaktion	145 (46%)	43 (22%)	
	188 (37%)		4 (18%)

Tabelle 2: Ergebnisse des Borrelien-Elispots

Das Ergebnis der EliSpot Untersuchung in der Normalbevölkerung korreliert relativ gut mit der Borrelien-Seroprävalenz, welche in Süddeutschland (Bayern und Baden-Württemberg) mit etwa 10-15% angegeben wird. Die in unserer Studie ermittelte leicht erhöhte „T-Zell-Prävalenz“ von 18% kann auf eine höhere Sensitivität der T-Tell-Diagnostik hinweisen,

könnte aber auch durch die verhältnismäßig geringe Probandenzahl bedingt sein. Hier wäre es sicher erstrebenswert weitere Untersuchungen an der Normalbevölkerung durchzuführen.

Eine solche Ergänzungsstudie an 200 Normal Spendern ist in unserem Labor derzeit im Gange. Die hohe Anzahl positiver Befunde aus Labor A erklärt sich durch die Patientenklientel der rheumatologischen Praxis mit überwiegend schweren rheumatischen Verlaufsformen und langen Krankheitsgeschichten. Eine weitere Subgruppierung in Patienten mit gesicherter klinischer Diagnose für Lyme-Borreliose erhöht die Detektionsrate auf nahezu 60%.

Die vorliegenden Daten lassen den Schluss zu, dass EliSpot die herkömmliche Borreliendiagnostik mit hoher Sensitivität und Spezifität unterstützen kann. Auch lassen sich bei akuten Fällen mit negativer Serologie Infektionen aufzeigen. Dies ist u.a. darin begründet, dass spezifische T-Zellen bereits vor dem Auftreten von Antikörpern nachweisbar sind. Damit wird das zeitliche Fenster der Diagnostik nach vorne verschoben, was sich für eine Antibiotika-Therapie begünstigend auswirkt. Die T-Zell-Diagnostik kann also nicht nur im Bereich von tuberkulösen Erkrankungen sinnvoll eingesetzt werden, sondern sollte auch im Bereich der diffizilen Borreliendiagnostik vermehrt in Betracht gezogen werden.

Untersuchungen zur Koinfektion mit Anaplasma phagocytophilum

Alle untersuchten Probanden wurden neben der Borreliendiagnostik zusätzlich mit einem Antigen spezifisch für Anaplasma phagocytophilum im EliSpot untersucht. Das nachfolgende Diagramm gibt die dabei erhaltenen Ergebnisse wieder:

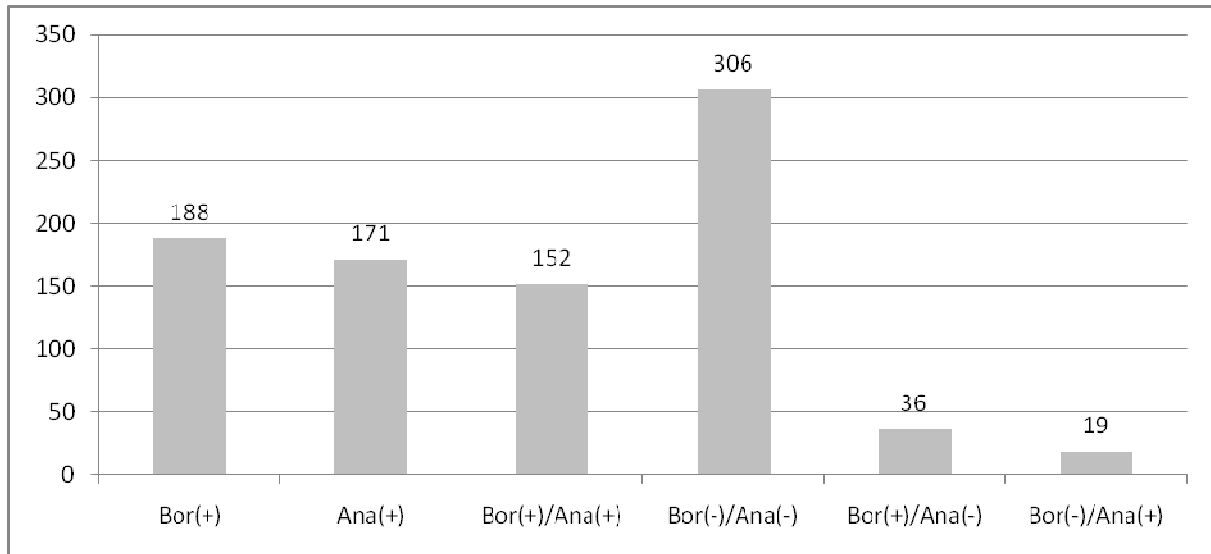


Diagramm 1: Koinfektion Bor: Borrelia, Ana: Anaplasma.

Die Daten zeigen, dass in unserem Patientenkollektiv die Durchseuchung mit Anaplasma nahezu den gleichen Level wie die Borrelieninfektionen erreicht. Zudem waren 152 der 513 Patienten (30%) mit beiden Erregern infiziert. Die überwiegende Mehrheit der koinfizierten Patienten wurde dabei aus Labor A nachgewiesen, von welchem überwiegend Patienten mit schwerwiegenden, teilweise chronischen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis rekrutiert wurden. Bei Betrachtung aller 188 Patienten mit reaktiven Ergebnissen auf das Borrelien-Antigen fällt auf, dass 81% dieser Patienten gleichzeitig mit Anaplasma infiziert waren.

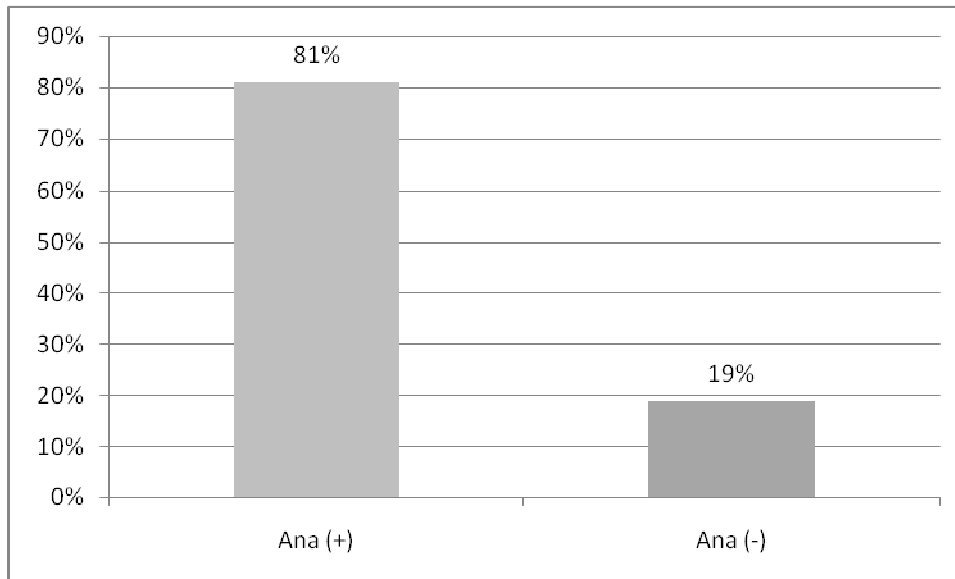


Diagramm 2: Anteil der Anaplasma positiven Reaktionen bei Borrelien positiven Patienten

Eine Kreuzreaktion kann ausgeschlossen werden, da durchaus auch Fälle auftraten die eine Anaplasma-Antwort, aber keine positive Reaktion auf Borrelienantigene zeigten. Um eine mögliche Kreuzreaktion weiter auszuschließen untersuchten wir 40 koinfizierte Patienten zusätzlich mit einem Antigen spezifisch für *Chlamydomphila pneumoniae* und konnten nur in wenigen Fällen, der durchschnittlichen Durchseuchungsrate entsprechend, eine positive Reaktion feststellen. Da *Chlamydomphila pneumoniae* ebenso wie Anaplasma zu den intrazellulären Parasiten zählt, sollte damit die Spezifität des Antigens weiter gewährleistet sein.

Dieses Ergebnis liegt im Einklang mit neuesten Erkenntnissen anderer Gruppen die zwar regional stark unterschiedliche Koinfektionsraten zeigten, tendenziell aber unser Ergebnis untermauern. So konnte letztes Jahr in einer dänischen PCR-Studie an Zecken gezeigt werden, dass die Prävalenz von Anaplasma in Teilen Dänemarks mit 24% über der von *Borrelia* (11%) liegt. Weiterhin zeigten die Autoren das 40% der adulten Zecken und 14% der Nymphen mit Anaplasma infiziert waren (Skarphédinsson, Lyholm, 2007).

Untersuchungen zum Therapieerfolg bei Borreliose-Patienten

Bei 42 Patienten aus Labor A lagen Angaben zu mindestens einer durchgeführten Therapie vor. Wir definierten Patienten mit positivem EliSpot als potentielle Therapieversager und stuften ein negatives EliSpot Ergebnis als erfolgreiche Therapie ein. Beide Gruppen wurden auf eine mögliche Infektion mit Anaplasma untersucht. Tabelle 3 zeigt das dabei erzielte Ergebnis:

	42	Anaplasma pos.	Anaplasma neg.
Erfolgreiche Therapie (Bor EliSpot negativ)	26	7	19
Erfolglose Therapie (Bor EliSpot positiv)	16	14	1 (& 1xGrenzwert)

Sehr viele Patienten mit erfolgloser Therapie (definiert als Borrelien-EliSpot positiv) waren gleichzeitig Anaplasma positiv (14 von 16). Ein Patient zeigte darüber hinaus ein grenzwertiges Resultat. Umgekehrt zeigten lediglich 7 von 26 Patienten ohne nachweisbare spezifische T-Zellen gegen Borrelien-Antigen bzw. nach Definition erfolgreich therapiert, eine positive Antwort im Anaplasma EliSpot. Ein durchgeführter nicht-parametrischer Kruskal-Wallis-Test erbrachte einen signifikanten Unterschied beider Gruppen ($p < 0,001$).

Obwohl diverse Arbeiten bereits einen direkten Zusammenhang zwischen einer zusätzlichen Infektion mit Anaplasma und/oder Babesia und einem schweren Verlauf der Borreliose vermuten lassen (Jarefors, 2005), bleibt diese Hypothese im Moment spekulativ. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass eine Zweitinfektion mit Anaplasma zu einer reduzierten IL-12 Antwort auf Borrelien-Antigene führt, was letztlich zu einer verzögerten Th1-Antwort und damit möglicherweise zu einer verlängerten Infektionsphase bis hin zu einem stark erhöhten Risiko eine chronische Borreliose zu entwickeln, führt (Widhe, 2004). Weitere, genau auf diese Fragestellung konzipierte Arbeiten, an weiteren Patientkollektiven sind notwendig um diese Arbeitsthese weiter zu untersuchen.