

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. D. Reinhardt

**Charakterisierung der humoralen und zellulären
Immunantwort auf *Borrelia burgdorferi* und
die Borrelien-Proteine OspC und Osp17
bei pädiatrischen Patienten
mit akuter Lyme-Borreliose**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Angelika Kaunicnik
aus Starnberg

2006

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. D. Reinhardt

**Charakterisierung der humoralen und zellulären
Immunantwort auf *Borrelia burgdorferi* und
die Borrelien-Proteine OspC und Osp17
bei pädiatrischen Patienten
mit akuter Lyme-Borreliose**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Angelika Kaunicnik
aus Starnberg

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Priv. Doz. Dr. med. A. Pohl-Koppe

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. R. Haas

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. E. Meinel

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2006

Herrn Wilhelm Fischhaber † und Frau Centa Fischhaber †

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Der Erreger: <i>Borrelia burgdorferi</i>	9
1.2	Epidemiologie	10
1.3	Klinische Manifestationen	10
1.3.1	Hautmanifestationen	11
1.3.2	Neuroborreliose	12
1.3.3	Manifestationen am Bewegungsapparat - Lyme-Arthritis	13
1.3.4	Kardiale Manifestationen	14
1.3.5	Ophthalmologische Manifestationen	14
1.3.6	Extraartikuläre Manifestationen im muskuloskeletalen System	14
1.3.7	Post-Lyme-Syndrom, Therapie-refraktäre Lyme-Arthritis	15
1.3.8	Natürlicher Verlauf und Langzeitprognose	15
1.3.9	Co-Infektionen	15
1.4	Diagnostik	16
1.4.1	Lyme-Serologie	16
1.4.2	Direkte Nachweismethoden	16
1.5	Therapie	17
1.5.1	Antibiotische Therapie	17
1.5.2	Prävention und Prophylaxe	18
1.6	Pathogenetische Mechanismen und Immunantwort der Lyme-Borreliose	18
1.6.1	Die Rolle der unspezifischen Immunantwort gegen <i>B. burgdorferi</i>	19
1.6.2	Die Rolle der spezifischen Immunantwort gegen <i>B. burgdorferi</i>	19
1.6.3	Das Th1/Th2 Paradigma	21
1.6.4	Immunsystem-Evasion von <i>B. burgdorferi</i>	22
1.7	Impfung	23
1.8	Zusammenfassung	24
2	Fragestellung und Zielsetzung	25
3	Patienten, Material und Methoden	26
3.1	Studien- und Kontrollpatienten	26
3.1.1	Patienten	26
3.1.2	Kontrollen	30

3.1.3	Etablierung der Lymphoproliferations-Assays	30
3.2	Serologische Untersuchungen	31
3.3	Material und Methoden	31
3.3.1	Reagentien	31
3.3.2	Isolierung der blutmononukleären Zellen (PBMC)	32
3.3.3	Lymphoproliferations Assays	33
3.3.3.1	Negativ- und Positivkontrollen	34
3.3.3.2	Vorversuche zur Etablierung der Lymphoproliferations-Assays	34
3.3.4	FACS-Analysen	34
3.3.5	Messung der Zytokin-Sekretion im Zellkulturüberstand	35
3.3.6	Statistische Analysen	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Serologische Untersuchungen	37
4.1.1	Serologie zum Zeitpunkt der Diagnosestellung	37
4.1.2	Serologische Verläufe	41
4.2	Lymphoproliferation auf B. burgdorferi und Tetanustoxoid bei Kindern mit akuter Lyme-Borreliose	47
4.2.1	Vorversuche zur Etablierung der Lymphoproliferations-Assays	47
4.2.1.1	Autologes Serum versus gepooltes humanes Serum:	47
4.2.1.2	Antigentitrationen	48
4.2.1.3	Bestimmung der Kulturdauer:	49
4.2.1.4	Altersabhängigkeit der zellulären Reaktivität auf Borrelia-Antigene und Tetanustoxoid	50
4.2.2	Phänotypische Analyse von PBMC vor und nach Stimulation mit B. burgdorferi und Tetanustoxoid	51
4.2.3	Zelluläre und humorale Immunreaktion auf B. Burgdorferi und rekombinante Borrelien-Proteine	52
4.2.3.1	Lymphoproliferation auf B. burgdorferi-Lysate	53
4.2.3.2	Lymphoproliferation auf rekombinantes OspC	55
4.2.3.3	Lymphoproliferation auf rekombinantes Osp17	57
4.2.3.4	Lymphoproliferation auf das rekombinante Borrelia-Protein p39	59
4.2.3.5	Lymphoproliferation auf das rekombinante Borrelia-Protein p41	60
4.2.3.6	Lymphoproliferation auf Tetanustoxoid	61
4.2.4	Einfluß der Therapie auf das Proliferationsverhalten	61

4.3	Zytokinsekretion B. burgdorferi-spezifischer Lymphozyten	63
4.3.1	Interferon- γ (IFN- γ) Sekretion	63
4.3.2	Sekretion von IL-10	66
4.3.3	Sekretion von IL-4	68
4.3.4	Zytokin-Sekretion bei Co-Stimulation mit IL-12	69
4.3.4.1	IFN- γ Sekretion bei Co-Stimulation mit IL-12	69
4.3.4.2	IL-10 Sekretion bei Co-Stimulation mit IL-12	71
4.3.4.3	IL-4 Sekretion bei Co-Stimulation mit IL-12	72
4.3.4.4	IL-12 induziert gleichzeitige Sekretion von IFN- γ und IL-10 Borrelia-spezifischer Zellen	73
5	Diskussion	75
5.1	Humorale Immunantwort auf B. burgdorferi	75
5.1.1	Antikörperuntersuchung im Serum zum Zeitpunkt der Erstdiagnose	75
5.1.2	Humorale Immunantwort im Verlauf der Infektion	78
5.2	Zelluläre Immunreaktion bei pädiatrischen Patienten mit akuter Lyme-Borreliose	81
5.2.1	Zelluläre Immunreaktion auf B. burgdorferi-Lysate	82
5.2.2	Zelluläre Immunreaktion auf rekombinante Borrelia-Proteine	83
5.2.2.1	Zelluläre und humorale Immunreaktion auf OspC	83
5.2.2.2	Zelluläre und humorale Immunreaktion auf Osp17	85
5.2.3	Zelluläre und humorale Immunreaktion auf die rekombinanten Borrelia-Proteine p39 und p41	86
5.2.4	Lymphoproliferation auf Tetanustoxoid	87
5.2.5	Charakterisierung der zellulären Immunreaktion im Verlauf der Infektion - Einfluß der antibiotischen Therapie auf die zelluläre Immunantwort	87
5.3	Zytokin-Sekretion von B. burgdorferi-spezifischen T-Zellen	88
5.3.1	Die Rolle der IFN- γ Sekretion	88
5.3.2	IL-10 Sekretion	89
5.3.3	IL-12 induziert gleichzeitige IL-10 und IFN- γ Sekretion B. burgdorferi-spezifischer Zellen	90
5.3.4	IL-4 Sekretion	92
6	Zusammenfassung	94

7	Literatur	97
8	Tabellarische Auflistung der untersuchten Lyme-Patienten und Kontrollen.	110
9	Abkürzungsverzeichnis	116
10	curriculum vitae	117

1 Einleitung

Die Lyme-Borreliose verdankt ihren Namen der Stadt Old Lyme, Connecticut, U.S.A., in der im Jahre 1975 eine Häufung von 12 Fällen von akuter Arthritis bei Kindern auftrat (Steere et al. 1977). Der Erreger der Erkrankung, eine Treponemen-ähnliche Spirochäte, wurde 6 Jahre später, 1981, von Willi Burgdorfer aus einer Zecke isoliert, und nach ihrem Entdecker benannt: *Borrelia burgdorferi* (Burgdorfer et al. 1982).

1.1 Der Erreger: *Borrelia burgdorferi*

Borrelia burgdorferi (*B. burgdorferi*) ist eine Gram-negative Spirochäte (Hahn et al. 1991, Franz und Krause 2003) und weist einige der charakteristischen Strukturmerkmale dieser Gattung auf: Das Bakterium ist helixförmig aufgebaut und beweglich. Eine äußere Zellmembran umgibt den Protoplasmazyylinder-Komplex, bestehend aus Zytoplasma, der inneren Zellmembran und dem Periplasma mit Flagellen, die jeweils an den Enden des Protoplasmazyinders ansetzen (Barbour und Hayes 1986a).

Das Genom von *B. burgdorferi* (Stamm B31), besteht aus einem kleinen, linearen Chromosom von 950 KB, sowie 9 linearen und 12 ringförmigen Plasmiden (Fraser et al. 1997), auf denen unter anderem eine Anzahl ihrer Proteine der äußeren Zellmembran (Outer surface Proteine, Osp) kodiert sind. Beschrieben sind mittlerweile OspA – F, sowie Osp17 und ein weiteres Lipoprotein, VlsE, die wichtige Immunogene darstellen. Sie werden variabel exprimiert, wodurch es *B. burgdorferi* vermutlich ermöglicht wird, sich an die verschiedenen Wirte anzupassen und sich deren Immunantwort zu entziehen (Barbour und Hayes 1986a, Norris et al. 1992, Saint Girons et al. 1994, Marconi et al. 1994, Lam et al. 1994, Wilske et al. 1995, de Silva und Fikrig 1997, Zhang und Norris 1998, Jauris-Heipke et al. 1999). Weitere immunodominante Proteine sind das Flagella-Antigen p41 (Barbour et al. 1986b), das 58 kDa Antigen, ein "Heat-Shock"-Protein (HSP, Hansen et al. 1988) und das Membranprotein p39 (Simpson et al. 1990). *B. burgdorferi* besitzt nur wenige Proteine mit biosynthetischer Aktivität, daher ist ihr Stoffwechsel stark vom Wirtsorganismus abhängig (Barbour und Hayes 1986a). Im Genom von *B. burgdorferi* sind keine Äquivalente für toxinbildende Systeme enthalten. Der einzige bekannte Virulenzfaktor sind die Outer Surface Proteine, die eine wichtige Rolle bei der Adhäsion und Invasion in die Wirtszelle spielen (Sadziene et al. 1993).

1.2 Epidemiologie

Bisher sind mindestens 10 Spezies von *Borrelia burgdorferi* sensu lato bekannt, von denen 3 sicher humanpathogen sind: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* und *B. garinii* (Baranton et al. 1992, Godfroid et al. 1995, Wang et al. 1999). In Europa kommen alle 3 humanpathogenen Spezies, in den U.S.A. nur *B. burgdorferi* sensu stricto vor. Im Sinne eines Organotropismus scheinen die verschiedenen Spezies bevorzugt unterschiedliche Systeme zu befallen, so wird *B. afzelii* häufig bei Hautmanifestationen (Canica et al. 1993, Wilske et al. 1993d) und *B. garinii* vorwiegend aus Liquorproben von Patienten mit Neuroborreliose isoliert (Wilske und Preac-Mursic 1993b). *B. burgdorferi* sensu stricto wird vor allem mit der Lyme-Arthritis assoziiert, die jedoch auch von den beiden anderen Spezies hervorgerufen werden kann (Lünemann et al. 2001).

Die Lyme-Borreliose wird durch Zecken der Gattung *Ixodes* übertragen: In Europa durch *Ixodes ricinus*, in den U.S.A. durch *Ixodes dammini*. Die Entwicklung der Zecken von der Larve über die Nymphe zur adulten Form erstreckt sich über 1 – 2 Jahre. Der Übergang in ein höheres Stadium erfordert jeweils eine Blutmahlzeit. Die Zecke bevorzugt als Lebensraum vor allem Waldgebiete, kommt jedoch nicht nur im Unterholz, sondern auch in Gärten und Parks vor. Es besteht ein Nord- Südgefälle und eine regional unterschiedliche Durchseuchung der Zecken, von denen in Deutschland in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium 10 - 30% mit Borrelien infiziert sind (Fingerle et al. 1995, Priem et al. 2002). Die Übertragungsrate nach einem Zeckenstich beträgt allerdings nur 10%, da sie von der "Haftzeit" der Zecke abhängt, und erst nach 24 Stunden deutlich ansteigt (Maiwald et al. 1998). In manchen endemischen Gebieten Europas lag die jährliche Inzidenz der Lyme-Borreliose bei 111 (Region Würzburg, Huppertz et al. 1999) bis 160 (Südschweden, Berglund et al. 1995) Fällen pro 100.000 Einwohner. Dabei ist die Inzidenz bei Kindern unter 16 Jahren höher als bei Erwachsenen.

1.3 Klinische Manifestationen

Die Klinik der Lyme-Borreliose wird in frühe und späte Manifestationen eingeteilt, weiterhin können lokale von generalisierten Symptomen unterschieden werden.

Frühe bzw. akute Manifestationen treten Tage bis Wochen nach Zeckenstich auf und sind selbstlimitierend. Späte oder chronische Manifestationen treten Monate bis Jahre

nach Zeckenstich auf, können nach einem rezidivierendem Verlauf chronisch werden und dann auch zu bleibenden Organschäden führen. Frühe Manifestationen können in Späte übergehen, jedoch können späte Manifestationen ohne vorangehende frühe auftreten. Klinisch hat sich die Einteilung in Stadien bewährt:

- Stadium I: Akute lokale Infektion (Erythema migrans)
- Stadium II: Akute systemische Infektion
- Stadium III: Chronische Infektion

1.3.1 Hautmanifestationen

Mit bis zu 80% der Fälle tritt das Erythema migrans (EM), das bereits 1910 von Afzelius beschrieben wurde (Afzelius 1910) am häufigsten auf (Steere 1989). Das EM tritt wegen der jahreszeitlich begrenzten Zeckenaktivität meist zwischen April und Oktober auf. Tage bis Wochen nach einem Zeckenstich, der wegen der anästhesierenden Wirkung des Zeckenspeichels oft unbemerkt bleibt, entwickelt sich eine nicht juckendes, schmerzloses, sich zentrifugal ausbreitendes Erythem, oft mit zentraler Abblassung.

Obwohl das Erythema migrans als lokale Manifestation gilt, kann es, in Europa seltener als in den U.S.A., zu allgemeiner Begleitsymptomatik wie Fieber, Lymphknotenschwellung, Übelkeit kommen, was in diesen Fällen auf eine beginnende systemische Ausbreitung hinweist (Strle et al. 1999, Wormser et al. 2000a). Eine Spontanremission des EM ist häufig, ein unbehandeltes EM jedoch kann rezidivieren oder zu einer systemischen Infektion führen.

Primär multilokuläre Ausbreitungen, multiple Erythemata migrantes (mEM), werden bereits als systemische Erkrankung gewertet (Schwarzenbach und Djawari 1999). Bei Kindern tritt das EM am häufigsten im Kopf- und Schulterbereich auf.

Wesentlich seltener als das EM ist das Borrelien-Lymphozytom (BL), eine Lymphom-ähnliche Hautläsion, die bereits 1911 erstmals beschrieben (Burckhardt 1911) und später als Lymphadenosis benigna cutis (Bärfverstedt 1943) bezeichnet wurde. Das BL, das ausschließlich in Europa vorzukommen scheint (Gerber et al. 1996), imponiert als livide, teilweise juckende oder schmerzhaftige Schwellung mit Prädilektion an Ohrläppchen, oder -muschel, Mamillen oder Skrotum (Asbrink et al. 1989, Albrecht et al. 1991, Gautier et al. 1995). Die Läsion tritt zumeist mit einer Latenz von Wochen bis Monaten nach Zeckenstich auf und gehört bereits zu den systemischen Formen der

akuten Lyme-Borreliose, die unbehandelt über Monate persistieren, sowie in andere Manifestationen übergehen kann (Strle et al. 1992).

Als späte, chronische Manifestation der Lyme-Borreliose, die fast ausschließlich bei Erwachsenen, und häufiger in Europa, als in den U.S.A. auftritt, kann es zur Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) kommen. Die ACA wurde erstmals vor über 100 Jahren von Buchwald (Buchwald 1883) und später von Herxheimer (Herxheimer und Hartmann 1902) beschrieben. Prädilektionsstellen sind die Akren und die Haut über den Gelenken. Die ACA verläuft nach einer Latenz von Monaten bis Jahren biphasisch, mit einem akut-entzündlichen und einem chronisch-atrophischen Stadium. Häufig assoziiert sind Schmerzen der unter dem betroffenen Hautareal gelegenen Gelenke (Franz und Krause 2003), oder eine Mononeuritis multiplex (Christen et al. 1993). *B. afzelii* konnte am häufigsten, jedoch nicht ausschließlich, aus ACA-Biopsien isoliert werden (Lünemann et al. 2001).

1.3.2 Neuroborreliose

Innerhalb von Wochen bis wenigen Monaten nach einer Infektion entwickeln etwa 15% aller unbehandelten Patienten Symptome einer akuten Neuroborreliose (Steere 2001). Ein EM geht nur in ca. 50% voraus (Pfister und Einhäupl 1986):

Zu den frühen, akuten Manifestationen der Neuroborreliose gehören im Kindesalter vor allem die periphere Fazialisparese (FP) und die lymphozytäre, seröse Meningitis, auch als aseptische Meningitis bezeichnet, mit oder ohne Hirnnervenbeteiligung. Diese beiden Manifestationen machen insgesamt bis zu 80% der Neuroborreliosen im Kindesalter aus.

Auf Grund der kurzen Inkubationszeit liegt die saisonale Häufung vor allem in den Sommer- und Herbstmonaten. 30 - 50% der im Kindesalter auftretenden Fazialisparesen und 10 - 15% der aseptischen Meningitiden (aM) werden durch *B. burgdorferi* verursacht. In der Differentialdiagnostik der Fazialisparese sprechen ein vorausgegangener Zeckenstich und ein EM, konsekutiv bilaterales Auftreten, sowie eine Reizpleozytose im Liquor cerebrospinalis für eine *B. burgdorferi*-bedingte Fazialisparese (Christen et al. 1993). Die Borrelienmeningitis geht mit einem deutlich beeinträchtigten Allgemeinbefinden und rezidivierenden Kopfschmerzen einher. Fieber und meningeale Symptomatik sind meist gering ausgeprägt.

Seltenere Manifestationen der Neuroborreliose sind isolierte Hirnnervenausfälle

(Abduzens-, Trochlearis- und Okulomotoriuspareesen, Neuritis Nervi Optici, oder Vestibularisausfälle), fokale Enzephalitis, Guillain-Barré-Syndrom, Meningoenzephalitis, Bannwarth-Syndrom, rezidivierende Kopfschmerzen, sowie zerebelläre Ataxie (Christen et al. 1993, Steere 2001). Im Erwachsenenalter steht meist die sehr schmerzhaft Polymeningoradikulitis (Bannwarth-Syndrom) im Vordergrund, die von Sensibilitätsstörungen, Parästhesien und Hirnnerven-, sowie milden Extremitätenpareesen, oder chronischen Kopfschmerzen begleitet werden kann (Kaiser 1998a, Franz und Krause 2003).

Die seltenen Manifestationen der chronischen Neuroborreliose, die Monate bis Jahre nach einer Infektion auftreten können, umfassen distale symmetrische Polyneuropathien oder eine Mononeuritis multiplex, beides oft im Zusammenhang mit einer ACA, sowie Schlaganfall-ähnliche Symptomatik, die vermutlich durch eine zerebrale Vaskulitis hervorgerufen wird (Wilke et al. 2000), chronisch progrediente Enzephalitis und (Meningo-)Enzephalomyelitis mit zunehmender spastischer Para-, Tetra- oder Hemiparese. Seltene Fälle von MS-ähnlicher demyelinisierender Enzephalopathie wurden beschrieben (Pacher et al. 1989). Weitere Manifestationen können kognitive Ausfälle, Gedächtnisverlust und Konzentrationsstörungen sein. Die Abgrenzung von neuropsychiatrischen und neurotischen Störungen bereitet in diesen Fällen jedoch oft Schwierigkeiten.

1.3.3 Manifestationen am Bewegungsapparat - Lyme-Arthritis

Während der frühen systemischen Borreliose kommen häufig intermittierende Arthralgien wechselnder Lokalisation vor. Akute Arthritiden, die sich als akute Monarthritis eines großen Gelenks, oder Oligoarthritis mit intermittierendem Verlauf manifestieren, haben eine längere Inkubationszeit von in der Regel Wochen bis mehreren Monaten. Am häufigsten (mit)betroffen ist in bis zu 95% der Fälle das Kniegelenk (Huppertz et al. 1995). Klinisch stehen Gelenkschwellung und Ergußbildung im Vordergrund, die Zellzahl der Synovialflüssigkeit kann bis zu 50.000/ μ l betragen, mit Überwiegen der neutrophilen Granulozyten (Huppertz und Krause 2003). Die Lyme-Arthritis (LA) verläuft häufig episodisch, das heißt, die Symptomatik bildet sich zwar nach einigen Tagen bis Wochen spontan zurück, ohne antibiotische Behandlung rezidiert die LA jedoch nach einem symptomfreien Intervall von Wochen bis Monaten. Die Intervalle können kürzer, die Arthritis chronisch werden.

In manchen Fällen kann die LA auch primär chronisch verlaufen. Die histologischen Befunde der Synovialmembran bei chronischer LA unterscheiden sich nicht von denen der rheumatoiden Arthritis (Sigal 1998), in diesem Fall kann ein Nachweis von Spirochäten mittels PCR-Analyse hilfreich sein. Die Prognose der antibiotisch behandelten akuten LA ist sehr gut, nur etwa 10%, bei Kindern bis zu 20% der Patienten sprechen nicht auf antibiotische Behandlung an (Bentas et al. 2000, siehe auch Post-Lyme-Syndrom).

1.3.4 Kardiale Manifestationen

Die Lyme-Karditis ist insgesamt selten und kommt bei etwa 5% der unbehandelten Patienten vor. Sie kann sowohl neben einem Erythema migrans, als auch neben allen anderen Formen der akuten systemischen Borrelien-Infektion bestehen. Typische Manifestationen sind Reizleitungsstörungen mit unterschiedlich ausgeprägten, zum Teil rasch wechselnden AV-Überleitungsstörungen, sowie auch ventrikulären Leitungsstörungen, Vorhoffibrillationen oder Tachykardien. Vor allem bei jüngeren Patienten sind Reizleitungsanomalien in Abwesenheit besonderer Risikofaktoren verdächtig für eine Lyme-Karditis (Steere 2001, Franz und Krause 2003). Berichtet wurden auch seltene Fälle von Myokarditis mit Perikarderguß, außerdem konnte *B. burgdorferi* in einigen Fällen aus Endomyokard-Biopsien von Patienten mit chronischer dilatativer Kardiomyopathie isoliert werden (Stanek et al. 1990, Lardieri et al. 1993).

1.3.5 Ophthalmologische Manifestationen

Veränderungen am Auge sind selten und umfassen Konjunktivitis, sowie alle Formen einer akuten Uveitis (Iritis, Zyklitis, Chorioiditis und Panuveitis). In chronischen Stadien kann eine Uveitis, Keratitis oder Episkleritis auftreten (Franz und Krause 2003).

1.3.6 Extraartikuläre Manifestationen im muskuloskeletalen System

Wesentlich seltener als die LA kommen andere rheumatologische Symptome vor, wie Tenosynovitis und Bursitis. Obwohl Myalgien ein häufiges Begleitsymptom der Lyme-Borreliose sind, tritt eine tatsächliche (Dermato-)Myositis nur vereinzelt auf. Dennoch konnte in diesen Fällen der Erreger in Muskelbiopsien nachgewiesen werden (Atlas et al. 1988, Franz und Krause 2003).

1.3.7 Post-Lyme-Syndrom, Therapie-refraktäre Lyme-Arthritis

Bei einer geringen Anzahl von Lyme-Patienten bleiben, trotz standardgemäßer antibiotischer Therapie, weiterhin multiple, zumeist unspezifische Beschwerden über einen längeren Zeitraum bestehen. Es handelt sich hierbei um die (oft subjektiven) Beschwerden des Post-Lyme-Syndroms, wie chronische Müdigkeit, Leistungsabfall und kognitive Beeinträchtigungen, sowie Muskel- und Gelenkschmerzen. Diese Erscheinungen ähneln in vielen Fällen Krankheitsbildern wie der Fibromyalgie, oder dem chronic-fatigue-Syndrom und stellen zum Teil eine erhebliche Beeinträchtigung der Lebensqualität dar. Bei den meisten Patienten erwiesen sich wiederholte antibiotische Behandlungen als erfolglos und die Pathomechanismen dieses Post-Lyme-Syndroms sind bisher noch teilweise ungeklärt (Klempner et al. 2001, Shadick et al. 1999). Darüber hinaus gibt es eine Form der Therapie-refraktären Lyme Arthritis, bei der unter anderem Autoimmun-Prozesse und molekulares Mimikry im Zusammenhang mit OspA diskutiert werden (s.u., Steere et al. 2001, Gross et al. 1998, Lin et al. 2001).

1.3.8 Natürlicher Verlauf und Langzeitprognose

Lyme-Patienten klagen in manchen Fällen auch bis zu 20 Jahre nach Erkrankung häufiger über Gelenkschmerzen, Gedächtnis- und Konzentrationseinbußen, sowie eine Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes, jedoch konnten diese Erscheinungen in klinischen Studien nur teilweise objektiviert werden (Shadick et al. 1999, Kalish et al. 2001, Hu und Klempner 2001). Bei unbehandelten Lyme-Patienten konnten jedoch tatsächliche Residualsymptome, wie neurologische Defizite, Gelenkschmerzen und Schlafstörungen beobachtet werden (Kalish et al. 2001). Insgesamt hat die behandelte Lyme-Borreliose jedoch eine exzellente Prognose.

1.3.9 Co-Infektionen

Weitere vektorgebundene Erreger können selten (< 5%, Thompson et al. 2001) von Ixodes übertragen werden. Hierzu gehören das FSME-Virus, Babesia microti, Anaplasma phagocytophila (Humane granulozytäre Ehrlichiose), oder Bartonella henselae.

1.4 Diagnostik

Die Verdachtsdiagnose einer Lyme-Borreliose kann in vielen Fällen mit charakteristischer Symptomatik, insbesondere bei bestehendem Erythema migrans und/oder Zeckenstich in der Anamnese, klinisch gestellt werden. Serologische Untersuchungen, bei Neuroborreliose auch die Analyse des Liquor cerebrospinalis dienen der Bestätigung der Diagnose.

1.4.1 Lyme-Serologie

Ein serologischer Nachweis Borrelien-spezifischer Antikörper in Blut, bzw. Liquor wird bei Verdacht auf Lyme-Borreliose bzw. Neuroborreliose routinemäßig durchgeführt. Spezifische IgM-Antikörper sind im Serum nach durchschnittlich 3 – 4 Wochen nach Infektion, mit einem Maximum an Aktivität nach 6 – 8 Wochen, nachweisbar und fallen danach in der Regel langsam ab. IgG-Antikörper erscheinen etwa 6 – 8 Wochen nach Infektion und können normalerweise über Jahre hinweg nachgewiesen werden. Für die Beurteilung der serologischen Befunde ist zu beachten, daß sowohl IgG-, als auch IgM-Antikörper noch lange nach erfolgreicher antibiotischer Therapie persistieren können (Steere 2001).

Derzeit wird der routinemäßige Antikörpernachweis durch Suchtests wie ELISA oder IFT empfohlen, der im positiven Fall durch Immunoblot-Analyse (IB) bestätigt werden sollte. Eine Neuroborreliose sollte idealerweise durch Nachweis einer Erregerspezifischen intrathekalen Antikörperbildung verifiziert werden (Wilske et al. 1991).

Falsch-positive ELISA-Befunde im Serum können im Rahmen anderer Infektionen, wie EBV- oder VZV-Infektion (Berger 1993, Woelfle et al. 1998), sowie durch *Borrelia recurrentis*, *Treponema denticulata*, polyklonale B-Zell-Stimulation, oder Anwesenheit von Rheumafaktoren vorgetäuscht werden. Jedoch ist die Wahrscheinlichkeit einer Borreliose bei gleichzeitig bestehender typischer Klinik und/oder Nachweis hoher Antikörpertiter sehr hoch (Franz und Krause 2003).

1.4.2 Direkte Nachweismethoden

Ein direkter Erregernachweis oder die Anzucht von Borrelien aus Patienten-Material beweist eine Infektion. Beide Methoden bereiten große Schwierigkeiten und sind wenig sensitiv (Steere 2001). Der Erreger-Nachweis durch PCR-Analyse gewinnt

zunehmend an Bedeutung durch hohe prädiktive Genauigkeit einerseits, sowie die Möglichkeit der Spezifizierung und Quantifizierung des Erregers andererseits (Steere 2001). *B. burgdorferi*-DNA kann in Hautbiopsien von Patienten mit dermatologischen Manifestationen, Synovialflüssigkeit oder –gewebe von Patienten mit Lyme-Arthritis (Nocton et al. 1994, Priem et al. 1998), sowie in Liquorproben von Patienten mit akuter Neuroborreliose nachgewiesen werden (Nocton et al. 1996). Dennoch wird die PCR-Analyse derzeit aufgrund fehlender Standardisierung, sowie großer Varianz zwischen den verschiedenen Labors, noch nicht routinemäßig eingesetzt (Steere 2001).

1.5 Therapie

1.5.1 Antibiotische Therapie

Wegen der langen Generationszeit - ein Zyklus dauert etwa 12 Stunden (Barbour 1984) - von *B. burgdorferi* werden lange Zeiten der antibiotischen Behandlung empfohlen. Herxheimer-Reaktionen sind selten (Smith et al. 1998, Wormser et al. 2000b, Huppertz 2001).

Die Behandlung des EM, sowie der frühen systemischen Infektion, erfolgt mit Doxycyclin 200mg/Tag. Ein Vorteil der Doxycyclin-Therapie besteht in der Wirksamkeit gegen die Humane Ehrlichiose, die vor allem in den U.S.A. als Co-Infektion bestehen kann. Kinder unter 9 Jahren werden mit Amoxicillin 50 mg/kg/Tag in 3 Dosen über 2 (bis 3 Wochen) behandelt. In der Schwangerschaft sollte ebenfalls Amoxicillin gegeben werden. Bei bestehender Allergie hat sich Cefuroxim-Axetil als gute Alternative ergeben. Mittel der 2. Wahl sind Erythromycin und andere Makrolide (Steere 2001, Huppertz und Krause 2003).

Eine Neuroborreliose sollte immer parenteral behandelt werden (Dattwyler et al. 1997, Huppertz und Krause 2003). Zur Verfügung stehen Ceftriaxon 2g/Tag i.v. (Erwachsene, maximal 4 Wochen (Wormser et al. 2000b), bzw. 50 mg/kg/Tag (Kinder), sowie Cefotaxim 3x2 g/Tag i.v. (Erwachsene), bzw 150 mg/kg/Tag in 3 Dosen (Kinder). Penicillin G sollte nach neueren Ansichten nicht mehr verwendet werden (Huppertz und Krause 2003, Eppes 2003). Die Behandlungszeiträume liegen im Bereich von 2 – 4 Wochen.

Eine Lyme-Arthritis kann sowohl oral, als auch parenteral behandelt werden. Am häufigsten zum Einsatz kommen Doxycyclin p.o. und Ceftriaxon i.v. (Dattwyler et al. 1988a, Steere et al. 1994, Huppertz und Krause 2003).

1.5.2 Prävention und Prophylaxe

Meidung von Zeckenrevieren, Applikation von Repellents, oder Tragen hochschließender Kleidung ist oft wenig praktikabel. Ein Impfstoff gegen alle 3 der in Europa vorkommenden Borrelienspezies konnte bisher noch nicht entwickelt werden, ein Impfstoff gegen die in Nordamerika vorkommende Spezies *B. sensu stricto* wurde wegen unzureichendem Langzeitschutz, Nebenwirkungen und mangelnder Akzeptanz wieder vom Markt genommen.

Die postexpositionelle Einmalgabe von Antibiotika ist problematisch, da ein Großteil aller Zeckenstiche nicht bemerkt werden, oder eine dennoch auftretende Infektion verschleiert werden kann (Huppertz und Krause 2003). Die einzige sinnvolle Maßnahme scheint bisher die frühzeitige Entfernung aller Zecken nach regelmäßiger Inspektion des gesamten Körpers zu sein (Vignes et al. 2001).

1.6 Pathogenetische Mechanismen und Immunantwort der Lyme-Borreliose

Die verschiedenen Manifestationen einer akuten Lyme-Borreliose verlaufen zumeist selbstlimitierend, das heißt auch ohne antibiotische Therapie kommt es zu Spontanremissionen. In der Regel breitet sich die akute Infektion dann aber nach vorübergehender Beschwerdefreiheit systemisch aus und rezidiert. Daher ist in jedem Fall eine antibiotische Therapie erforderlich (Nocton und Steere 1995), die die Infektion in den akuten Stadien normalerweise zur Ausheilung bringt. Patienten mit späten, chronischen Manifestationen benötigen aber oft längere oder wiederholte antibiotische Regimes und leiden auch noch nach Therapie an residualen Symptomen: Sowohl bei Patienten als auch im Tierversuch konnte Erregermaterial mittels PCR nachgewiesen, nicht aber Borrelien in Zellkultur angezüchtet werden. Bei anderen Patienten konnte trotz persistierender Entzündung des Gewebes und deutlicher Immunantwort kein Nachweis von *B. burgdorferi* aus dem Gewebe erbracht werden (Therapie-refraktäre Lyme-Borreliose). In diesen Fällen werden Autoimmun-Mechanismen verantwortlich gemacht (Gross und Huber 2000). Diese Ergebnisse deuten einerseits darauf hin, daß bei der Bildung einer protektiven Immunreaktion gegen eine *B. burgdorferi*-Infektion sowohl Zellen der unspezifischen Immunantwort, als auch der spezifischen humoralen und zellulären Immunreaktion beteiligt sind. Andererseits scheinen sowohl Erreger-spezifische Mechanismen, als auch die Immunantwort des Wirts bei der Pathogenese der Erkrankung eine Rolle zu spielen.

1.6.1 Die Rolle der unspezifischen Immunantwort gegen B. burgdorferi

Zellen der unspezifischen Immunantwort (Neutrophile, Makrophagen etc.) tragen durch Produktion von inflammatorischen Zytokinen, Bildung von NO, oder direkte Reduktion der Spirochätenzahl zur Bekämpfung der Infektion bei (Weiss et al. 1994, Radolf et al 1991, Ma et al. 1994, Ma und Weiss 1993, Radolf et al 1995). Die Lyme-Borreliose ist jedoch vor allem in späten Stadien histologisch und klinisch durch Entzündungsreaktionen charakterisiert, die nicht im Verhältnis zu der geringen Anzahl der Erreger stehen, die in den entsprechenden Geweben vorgefunden werden. Dies spricht dafür, daß B. burgdorferi über Mechanismen verfügt, Entzündungsreaktionen zu verursachen oder zu verstärken:

Es konnte gezeigt werden, daß die Gen-Expression von Chemokinen in humanen Endothelzellen nach Stimulation mit sonifizierten B. burgdorferi hoch reguliert wird (Ebnet et al. 1996). Outer surface Lipoproteine (Osp) von Borrelia burgdorferi sind potente Makrophagen-Aktivatoren und induzieren proinflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1 und IL-6 (Radolf et al. 1995, Ma et al. 1994, Ma und Weiss 1993, Radolf et al. 1991). Eine weitere Rolle bei der Entzündung und Schädigung des Gewebes könnte die durch verschiedene Osps induzierte Expression von IL-8 spielen, einem Chemotaxis- und Aktivierungsfaktor für Leukozyten (Sprenger et al. 1997). Eine weitere Studie konnte die Induktion von IL-6 und IL-8 in humanen Endothelzellen durch OspA zeigen (Wooten et al. 1996). Borrelien-Lipoproteine, die an den Toll-like Rezeptor 2 binden und zur Produktion inflammatorischer Makrophagen-Zytokine führen, sind potente Aktivatoren der unspezifischen Immunantwort (Hirschfeld et al. 1999). Die wichtige pathogenetische Rolle der unspezifischen Immunabwehr konnte in weiteren Studien an Mäuse-Modellen erhärtet werden, wo man zeigen konnte, daß die Ausprägung der LA von der intakten Funktion von Granulozyten und NK-Zellen abhängt (Barthold und De Souza 1995). Bei einer Infektion mit B. burgdorferi bestehen die zellulären Infiltrate in Herzen bzw. Gelenken bei Mäusen größtenteils aus neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Barthold et al. 1993, Rudermann et al. 1995).

1.6.2 Die Rolle der spezifischen Immunantwort gegen B. burgdorferi

Bei der Beseitigung der Borrelien aus dem Organismus spielt jedoch vor allem die humorale Immunantwort eine wesentliche Rolle: Serum von mit B. burgdorferi

infizierten Mäusen, das nicht vorbehandelten Mäusen vor oder zum Zeitpunkt der Infektion mit *B. burgdorferi* infundiert wurde, konnte eine B.b.-Infektion verhindern (Barthold und Bockenstedt 1993). SCID (Severe combined immunodeficiency)-Mäuse, denen reife B- und T-Zellen fehlen, konnten durch Transfer von unselektierten, *Borrelia*-spezifischen Splenozyten vor einer Infektion geschützt werden, durch Transfer von *Borrelia*-spezifischen B-Zellen erhielten die SCID-Mäuse einen partiellen Infektionsschutz. Weder durch unvorbehandelte, noch durch *Borrelia*-spezifische T-Zellen alleine konnte ein Infektionsschutz etabliert werden. Diese Beobachtungen sprechen sowohl für die protektive Rolle der humoralen Immunantwort, als auch für die wichtige Rolle einer intakten T-zellulären Immunantwort (Schaible et al. 1994). Andererseits persistierte in weiteren Studien die Infektion *in vivo* trotz Anwesenheit spezifischer Serum-Antikörper gegen verschiedene *Borrelia*-Antigene (Aguero-Rosenfeld et al. 1996, Nocton und Steere 1995), was wiederum darauf hinweist, daß auch das T-lymphozytäre System eine wesentliche Rolle bei der protektiven Immunantwort gegen *B. burgdorferi* spielt.

Die Ergebnisse verschiedener Studien lassen jedoch vermuten, daß autoreaktive B- und T-Lymphozyten auch zur Pathogenese der Erkrankung beitragen: So konnten kreuzreaktive Antikörper zwischen dem *Borrelia*-Protein Flagellin (p41) und Epitopen humanen Nervengewebes (Sigal und Tatum 1988, Aberer et al. 1989, Fikrig et al. 1993, Sigal 1993), sowie zwischen den *Borrelia*-Proteinen OspA bzw. OspB und Synovia-Gewebe (Kalish et al. 1993) gefunden werden. OspA scheint auch ein Epitop zu sein, das bei Patienten mit chronischer, Therapie-refraktärer Arthritis von T-Lymphozyten vorzugsweise erkannt wird: Durch eine homologe Sequenz von OspA zum humanen Protein hLFA-1 binden beide Moleküle an synoviale T-Zellen HLA-DRB1 positiver Individuen (Molekulares Mimikry; Lengl-Janßen et al. 1994, Kamradt et al. 1996, Gross und Huber 2000, Steere et al. 2001, Guerau-de Arellano und Huber 2002). Zudem zeigen Patienten mit HLA-DR4 oft eine T- und B-Zell-Reaktivität gegen OspA (Gross et al. 1998). Weitere Studien zeigten die Präsenz von Autoantikörpern gegen Ganglioside bei Patienten mit Neuroborreliose (Garcia-Monco et al. 1993, Garcia-Monco et al. 1995).

Weitere Beobachtungen lassen vermuten, daß T-Zell-vermittelten Mechanismen zur Pathogenese der Lyme-Borreliose beitragen: Obwohl nicht erforderlich für deren Entstehung, haben sowohl CD4+ T-Helferzellen (Th), als auch CD8+ T-

Suppressorzellen (Ts) im Tier-Model einen Einfluß auf den Schweregrad der Arthritis (Lim et al. 1995, Rao und Frey 1995, Matyniak und Reiner 1995, Keane-Myers und Nickell 1995a). Zytokine, die von Th-Zellen sezerniert werden, spielen also sowohl bei der Kontrolle der Infektion, als auch bei deren Pathogenese eine Rolle. Studienergebnisse lassen darauf schließen, daß IL-4 einen protektiven Effekt vermittelt, IFN- γ und IL- α wirken eher permissiv für die Entstehung von Gewebsschäden (Matyniak und Reiner 1995, Keane-Myers und Nickell 1995b, Keane-Myers et al. 1996, Anguita et al. 1996). Durch Borrelien-Lipoproteine werden jedoch auch anti-inflammatorische Zytokine induziert, wie zum Beispiel IL-10 (Giambartolomei et al. 1998, Pohl-Koppe et al. 1998, Muellegger et al. 2000).

Die protektive Rolle der T-Zellen liegt in der Vermittlung und Modulation der Antikörper-Bildung durch T-Helfer-Zellen (Matyniak und Reiner 1995, Keane-Myers und Nickell 1995).

1.6.3 Das Th1/Th2 Paradigma

T-Lymphozyten werden in T-Helfer Zellen (Th) und T-Suppressorzellen (Ts) unterteilt. Th-Zellen sind CD4-positiv und exprimieren MHC-Klasse-II-Moleküle, Ts-Zellen sind CD8 positiv und exprimieren MHC-Klasse-I-Moleküle.

Naive T-Helferzellen (Th0) differenzieren auf Stimulation ihres T-Zell-Rezeptors und in Abhängigkeit von kostimulatorischen Signalen und bestimmten Zytokinen in Th1 und Th2 Zellen (Kamogawa et al. 1993, Seder und Paul 1994). Insbesondere das Zytokin IL-12 induziert eine starke Th1 Antwort, während IL-4 die Differenzierung von Th2 Zellen fördert. Th1 Zellen bewirken durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie IFN- γ und TNF eine starke proinflammatorische Reaktion. Dagegen sezernieren Th2 Zellen antiinflammatorische Zytokine, wie IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Durch diese Zytokine wird die Differenzierung von B-Zellen unterstützt und die Wirkung von IFN- γ gehemmt (Abbas et al. 1996). Die Differenzierung in Th1 oder Th2 Zellen ist auch abhängig von der Art des Pathogens. So induzieren z.B. Allergene eine klare Th2 Zytokinantwort. Die Differenzierung einer Th0 Zelle, die IFN- γ und IL-4 gleichzeitig sezerniert, in eine Th1 oder Th2 Zelle hat einen entscheidenden Einfluß auf die Pathogenese von Infektionskrankheiten: Die Widerstandsfähigkeit gegenüber einer Infektion wurde im Tiermodell durch die Entwicklung einer proinflammatorischen Th1 Zytokinantwort und die Chronizität derselben Infektion durch eine antiinflammatorische

Th2 Zytokinantwort gefördert (Reiner und Locksley 1995).

Während das Th1/Th2 Paradigma für verschiedene Infektionskrankheiten im Tiermodell gut definiert wurde, ist die Differenzierung T-Zellen beim Menschen bisher jedoch nicht klar beschrieben und die Reaktion humaner T-Zellen auf bestimmte Pathogene kann nicht so eindeutig in Th1 und Th2 Lymphozyten unterteilt werden (Romagnani 1994). Eine neue Population von CD4+ T-Lymphozyten, die in vitro in Anwesenheit von IL-12 gleichzeitig IFN- γ und IL-10 sezernieren, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen beobachtet (Gerosa et al. 1996, Windhagen et al. 1996, Pohl-Koppe et al. 1998). Dieses T-Zell-Subset, dessen sezerniertes Zytokinmuster ein proinflammatorisches und ein antiinflammatorisches Zytokin umfaßt, wurde jedoch bisher nicht ohne exogene Zugabe von IL-12 zu den Kulturen beobachtet. Ob diese Zellen auch in vivo existieren und welche biologische Bedeutung sie haben, bzw. ob sie bei der Pathogenese der Lyme-Borreliose eine Rolle spielen, ist bisher unklar.

1.6.4 Immunsystem-Evasion von *B. burgdorferi*

Obwohl eine Infektion mit *Borrelia burgdorferi* zu einer deutlichen humoralen und zellulären Abwehrreaktion führt, kommt es in einigen Fällen zur Etablierung einer chronischen Infektion. Dies läßt darauf schließen, daß *Borrelia burgdorferi* über Mechanismen verfügt der Immunantwort zu entgehen:

Ein wesentlicher Mechanismus von *B. burgdorferi*, sich der Immunantwort des Wirts zu entziehen, ist die Modulation bzw. sequentielle Expression von Oberflächen-Antigenen. Je nachdem, ob Borrelien im Labor kultiviert, aus Zecken, oder aus Patienten isoliert wurden, wiesen sie ein unterschiedliches Muster ihrer exprimierten Oberflächen-Antigene auf (Schwan et al. 1995, De Silva und Fikrig 1997, Schwan und Hinnebusch 1998). So wird OspA vorwiegend in nüchternen Zecken und in Kultur exprimiert, OspC hingegen ist ein üblicherweise während früher Stadien der humanen Lyme-Borreliose nachgewiesenes Oberflächenantigen (Padula et al. 1994). Im Gegensatz zu OspA ist OspC stärker heterogen (7 Serotypen bei OspA vs. > 20 Serotypen bei OspC; Wilske et al 1995, Wang et al. 1999). Da OspA regelmäßig in der Zecke exprimiert wird und die Invasion in den Wirt mit OspC-exprimierenden Borrelien stattfindet, könnte eine Ursachen der größeren Heterogenität von OspC darin liegen, daß es einer größeren abwehrbedingten Selektion unterliegt. Für das VlsE-Gen ist die

Gen-Rekombination unter dem Selektionsdruck der inflammatorischen Immunantwort beschrieben (Liang et al. 2002).

Ein weiterer Mechanismus, die Immunantwort zu umgehen, besteht darin, daß bestimmte Proteine der Spirochätenoberfläche der Immunabwehr den Zugang zu Membranliganden verwehren (Bunikis et al. 1998, Bunikis und Barbour 1999): Ein Beispiel für dieses Phänomen ist das P66-Integrin Membranprotein, ein Ligand für Antikörper und Angriffsort für Proteasen: In Abwesenheit bestimmter Oberflächenantigene, insbesondere OspA, konnten anti-P66 Antikörper binden, was zur Immobilisierung der Zelle führte und Trypsin konnte P66 spalten, wohingegen diese Effekte bei gleichzeitiger Expression von OspA verhindert wurden.

Ein anderer Mechanismus der angeborenen Immunabwehr zu entgehen ist die Komplement-Resistenz, eine spezie-abhängige, vorbestehende Resistenz gegenüber Komplement-vermittelter, bakteriolytischer Aktivität von humanem Serum (Kraicy et al. 2000).

1.7 Impfung

Mehrere Studien zur Rolle von OspA-spezifischen Antikörpern haben in den späten 90er Jahren zur Entwicklung einer OspA-Vakzine geführt:

1. OspA-Antikörper schützen vor Infektion im Tiermodell (Fikrig et al. 1990).
2. Antikörper gegen OspA (und OspB) haben in vitro einen direkten zytoziden Effekt auf *B. burgdorferi* (Coleman et al. 1992, Sadziene et al. 1992).

Hohe OspA-Antikörpertiter wirken protektiv, da die Elimination der Spirochäten während der Blutmahlzeit in der Zecke stattfindet, wo die AK die Borrelien im Zeckendarm abtöten (Fikrig et al. 1990, Fikrig et al. 1992). Dadurch kommt es zu keiner Upregulation von OspC, was notwendig ist, den Zeckendarm zu durchdringen und zu den Speicheldrüsen zu gelangen. Daher wird eine Infektion verhindert.

Leider wurde die OspA-Impfung aus mangelnder Akzeptanz und häufig nötiger Auffrischungen sowie aufgrund der Beobachtung, daß OspA-spezifische AK zu autoimmunen Kreuzreaktionen gegen Synovialzellen führen können (Steere et al. 2001, Guerau-de-Arellano et al. 2002) wieder vom Markt genommen.

1.8 Zusammenfassung

Der Stand der Forschung ist insgesamt dadurch gekennzeichnet, daß – trotz vielfältiger Erkenntnisse aus dem Tiermodell – bisher keine ausreichenden Erklärungen für die Entwicklung und Persistenz von systemischen Borrelien-Infektionen vorliegen.

In der Pathogenese der Erkrankung ist bisher nicht erforscht, warum es einerseits nach einer Infektion mit *B. burgdorferi* trotz mangelnder Antikörperbildung zu subklinischen Verläufen kommt, und warum es andererseits - trotz deutlicher humoraler Immunantwort - zur Erregerpersistenz im Organismus und zur Ausbildung chronischer Infektionen kommt.

In dieser Studie sollen deshalb weitere Untersuchungen zur humoralen, sowie zellulären Immunantwort auf Borrelien-Infektionen durchgeführt werden.

2 Fragestellung und Zielsetzung

Die Infektion mit *B. burgdorferi* kann trotz einer fulminanten humoralen Immunantwort zu einer multisystemischen Erkrankung mit chronischen Manifestationsstadien führen. Durch Tiermodelle ist die Beteiligung der T-zellulären Immunantwort an der Pathogenese akuter systemischer und chronischer Stadien bekannt. Diese Erkenntnisse legen nahe, daß auch beim Menschen neben der Antikörperbildung, die eine protektive Rolle spielt, ebenso die zelluläre Immunreaktion einen wesentlichen Einfluß auf die Entwicklung unterschiedlicher Manifestationen und der Etablierung systemischer Infektionen hat.

Um die pathogenetischen Mechanismen bei der Etablierung einer frühen Infektion genauer zu charakterisieren, war es daher das Ziel der vorliegenden Arbeit, die humorale und zelluläre Immunantwort gegen *B. burgdorferi* bei Kindern mit lokalen und akuten systemischen Manifestationen der Lyme-Borreliose näher zu untersuchen.

Zunächst sollte eine detaillierte Beschreibung der humoralen Immunantwort zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und im Verlauf erfolgen. Weiterhin sollte die T-zelluläre Immunantwort dieser pädiatrischen Patienten gegen *B. burgdorferi*-Lysantigene und einzelne, immunodominante Strukturproteine untersucht und diese mit der humoralen Immuneaktion verglichen werden. Proteine von besonderem Interesse sind:

1. Das Outer Surface Protein C (OspC), ein 20 kD Protein, das regelmäßig zu einem frühen Krankheitszeitpunkt exprimiert wird und häufig eine humorale Immunantwort hervorruft. Hierbei prädominieren Antikörper der IgM-Klasse (Wilske et al. 1993a).
2. Das Outer Surface Protein 17 (Osp17), das nur selten während früher, jedoch regelmäßig während später, chronischer Stadien der Infektion vorherrscht und häufiger eine IgG-Antwort induziert (Hauser et al. 1997, Wilske et al. 1999).
3. Das Membranprotein p39 (BmpA), ein weiteres immundominantes Strukturprotein, gegen das besonders in späteren Erkrankungsstadien häufig Antikörper gebildet werden (Simpson et al. 1990),
4. sowie das Flagella-Antigen p41, das ebenfalls häufig in frühen Stadien eine starke IgM- bzw. IgG-Antwort hervorruft (Craft et al. 1986).

Schließlich sollte die zelluläre Immunantwort auf *B. burgdorferi* funktionell charakterisiert werden. Daher sollten *B.b.*-reaktive T-Lymphozyten auf ihre Zytokinsekretion hin untersucht werden.

3 Patienten, Material und Methoden

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt.

3.1 Studien- und Kontrollpatienten

Im Zeitraum von Mai 1995 bis April 1998 wurden im Dr. von Haunerschen Kinderspital von 27 Patienten klinische Daten retrospektiv, ab Mai 1998 bis Juni 2000 von 37 Studien- und 18 Kontrollpatienten sowohl klinische als auch experimentelle Daten prospektiv erhoben. Neben Anamnese und körperlicher Untersuchung wurden folgende Parameter bei allen Kindern untersucht:

Borrelien-spezifische IgG- und IgM-Antikörper im Serum. Bei Patienten mit Neuroborreliose wurde zudem Protein- und Glukosegehalt, sowie Zellzahl und Borrelien-spezifische IgG- bzw. IgM-AK im Liquor cerebrospinalis untersucht.

- Blutbild, BSG, CRP, Leber- und Nierenparameter,
- EKG.

Zusätzlich wurde in 7 Fällen eine PCR-Analyse des Liquors, in einem Fall auch des Blutes durchgeführt. In 10 Fällen wurde die autochtone Antikörperproduktion (Liquor/Serum-Index nach Reiber) bestimmt und in weiteren 3 Fällen wurde der Liquor auf oligoklonale Banden untersucht (Tabellen I – V im Anhang).

Für die Untersuchung der zellulären Immunantwort wurde im Rahmen einer für diagnostische Zwecke stattfindenden Routineuntersuchung nach Einwilligung von Eltern und Patienten 2 - 5 ml heparinisiertes Vollblut entnommen.

3.1.1 Patienten

Es wurden insgesamt 54 Kinder (30 Knaben und 24 Mädchen) mit akuter Lyme-Borreliose im Alter von 4 bis 14 Jahren (Durchschnittsalter: 8,4 Jahre) untersucht.

Diagnosen:

1. 12/54 Kinder litten an kutanen Manifestationen einer akuten Lyme-Borreliose (durchschnittliches Alter: 7,2 Jahre):
 - 4/12 Kinder hatten ein isoliertes Erythema migrans (EM).
 - 1/12 Kind wies multiple Erythemata migrantes (mEM) auf,

- 7/12 Kinder hatten ein Borrelienlymphozytom (BL), davon wiesen 4 ein zusätzliches EM auf.
2. 36/54 Kinder hatten eine akute Neuroborreliose (Durchschnittsalter: 8,3 Jahre):
- 14/36 Kinder hatten eine isolierte periphere Fazialisparese ohne Meningitis-Zeichen, davon zeigten 4 Kinder zusätzlich ein oder mehrere EM.
 - 14/36 Kinder hatten eine aseptische Meningitis: Davon wiesen 3 Kinder ein begleit-EM auf. 7/14 Kinder zeigten zusätzlich eine Fazialisparese, 2/14 eine Abduzensparese. 5/14 Kinder hatten eine isolierte aseptische Meningitis auf.
 - 4/36 Kinder litten an einem Bannwarth-Syndrom. In dieser Gruppe war das durchschnittliche Alter mit 9,5 Jahren höher, als bei den übrigen Fällen mit NB. Alle 4 Kinder hatten ein bzw. multiple EM. Bei einem Kind (JH) wurden zunächst multiple EM und ein Bannwarth-Syndrom diagnostiziert. Der Patient wurde erfolgreich antibiotisch behandelt. Nach 12 Monaten trat bei dem Patienten ein BL auf im Sinne einer erneuten Infektion mit einem anderem Stamm von *B. burgdorferi*.
 - 2/36 Kinder litten an rezidivierenden, chronischen Kopfschmerzen.
 - Bei einem von 36 Kindern manifestierte sich die NB als zerebelläre Ataxie.
3. 7/54 Kinder wurden wegen einer akuten Lyme-Arthritis behandelt. Das Durchschnittsalter lag bei 11 Jahren. Bei einem Kind war anamnestisch 2 Jahre zuvor ein EM aufgetreten, das antibiotisch behandelt worden war.

Anamnese:

1. Zeckenstich: Insgesamt war in 27/54 Fällen ein vorausgegangener Zeckenstich (ZS) erinnerlich, in weiteren 2/54 Fällen war ein ZS bei einem Familienmitglied bemerkt worden. Die Latenz zwischen ZS und Krankheitsmanifestation bzw. Diagnosestellung bei diesen Kindern variierte zwischen einigen Tagen und mehreren Monaten.
2. Klinische Symptome: Bei 8/54 Patienten (14,8%) trat zu Erkrankungsbeginn Fieber auf, bei 9/54 Patienten (16,7%) konnten zervikale Lymphknotenschwellungen festgestellt werden. 28/54 Patienten (51,9%) gaben Kopfschmerzen und/oder allgemeines Krankheitsgefühl an.

Borrelien-Serologie:

Bei 48/54 Kindern konnte eine Borreliose durch positive Borrelien-spezifische IgG- und/oder IgM-Antikörper im Serum bestätigt werden (Tabelle 1, S. 28):

Bei den übrigen 6/54 Kinder mit akuter lokaler bzw. systemischer LB konnten zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung keine Borrelien-spezifischen Antikörper im Serum nachgewiesen werden. Bei diesen Kindern wurde die Diagnose LB auf Grund von klinischen Manifestationen gestellt:

2/6 Patienten wiesen ein EM auf (FP und AH), bei beiden war ein Zeckenstich vorausgegangen.

1/6 Patient litt an einem BL (CC), ein Zeckenstich war ebenfalls erinnerlich.

3/6 Patienten waren an einer NB erkrankt (AHI, EH und RA): Bei den Patienten AHI und EH konnten im Liquor Borrelien-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Ein zusätzliches EM war bei den Patienten EH und RA aufgetreten. Bei den Patienten AHI und RA war ein Zeckenstich vorausgegangen.

Tabelle 1: Antikörperstatus der Patienten

Diagnose	n	Antikörper im Serum (n = Anzahl der Kinder)			
		IgM-/IgG-	IgM+/IgG-	IgM+/IgG+	IgM-/IgG+
EM¹	4	2	1	1	.
IIK²	8	1	1	1	5
NB gesamt³	35	3	17	16	1
FP ⁴	14	1	9	5	.
aM ⁵	14	1	6	8	.
sonstige ⁶	7	1	2	3	1
LA⁷	7	.	.	2	5

IgM- bzw. IgG-Antikörper im Serum (ELISA) der 54 Patienten mit Lyme-Borreliose.

¹EM: Patienten mit EM im Alter von 8 - 10 (Ø 9,5) Jahren. ²IIK: Patienten mit kutanen Manifestationen der Lyme-Borreliose im Stadium II (BL, mEM) im Alter von 4 - 10 (Ø 6,6) Jahren. ³NB: Patienten mit akuter NB im Alter von 4 - 14 (Ø 8,2) Jahren. ⁴FP: Patienten mit Fazialisparese im Alter von 4 - 14 (Ø 8,1) Jahren. ⁵aM: Patienten mit aseptischer Meningitis im Alter von 4 - 13 (Ø 7,8) Jahren. ⁶sonstige: Patienten mit Bannwarth-Syndrom bzw. anderen Manifestationen einer akuten NB im Alter von 4 - 12 (Ø 9,3) Jahren. ⁷LA Patienten mit akuter LA im Alter von 9 - 14 (Ø 11,3) Jahren.

PCR: Eine PCR-Analyse des Liquors auf *B. burgdorferi* wurde bei 7/35 Kindern mit NB durchgeführt: In 2/7 Fällen konnte *B. burgdorferi* im Liquor nachgewiesen werden, beide Patienten litten an einer aseptischen Meningitis (GK, KF).

Oligoklonale Banden: Bei 3/35 Kindern konnte zusätzlich eine Liquor-Analyse auf oligoklonale Banden durchgeführt werden: In 2/3 Fällen konnten oligoklonale Banden nachgewiesen werden (MP, PLC mit aseptischer Meningitis).

Eine autochtone Antikörperproduktion mit einem Liquor/Serum-Index > 1,5 (nach Reiber) konnte bei 8/10 untersuchten Patienten nachgewiesen werden: FS, MT, NJ

und SST mit Fazialisparese, MW und PLC mit aseptischer Meningitis, EH und AA mit Bannwarth-Syndrom.

Weitere Laborparameter und technische Untersuchungen:

Das C-reaktive Protein (CRP) wurde bei allen Patienten bestimmt und lag bei 50/54 im Normbereich ($< 1,0$). Bei 2 Patienten mit BL wurde ein geringfügig erhöhter Wert gemessen (1,8 mg/dl bei Patientin CAS; 1,2 mg/dl bei Patientin ARÖ) und 2 Patienten mit LA hatten einen erhöhten CRP-Wert: von 7,9 mg/dl (PW) bzw. 4,9 mg/dl (DB). Bei den übrigen 5/7 Patienten mit LA wurde ebenfalls ein $CRP < 1,0$ gemessen. Jedoch ist anzumerken, daß die CRP-Analyse bei diesen 5 Patienten erst nach Beginn der antibiotischen Therapie stattgefunden hat.

Die Blutkörperchen-Senkungs-Geschwindigkeit (BKS) konnte bei 24/54 Kindern eruiert werden: 12/24 Patienten (50%) hatten eine BKS ≤ 20 mm/1.Stunde) und lagen im Referenzbereich. Bei 5/24 Patienten (20,8%) war die BKS leicht beschleunigt (13 – 20 mm/1. Stunde): CAS mit BL, FP mit EM, PN mit LA, RA und AB mit NB. Bei weiteren 7/24 Kindern (29,2%) konnten Werte > 20 mm/1. Stunde gemessen werden: PS mit EM; COH, MS, MW, PVR mit NB, sowie DB und DZ mit LA.

Blutbild, Leber- und Nierenparameter waren bei allen untersuchten Patienten insgesamt unauffällig.

Ein EKG wurde bei 26/54 Kindern durchgeführt. Bei 5/26 Kindern (19,2%) konnten Hinweise auf eine mögliche kardiale Manifestation gefunden werden: 2 Kinder hatten ein AV-Block I° (MZ und PLC), 3 Kinder hatten einen inkompletter Rechtsschenkel-Block (MZ, DR und EF). Bei einem Kind war der Befund verdächtig auf Myokarditis (AA).

Lymphoproliferations-Assays:

Von 37 Patienten konnten Lymphoproliferations-Assays generiert werden, davon 29/37 zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Bei 8/37 Kinder wurde die Lymphoproliferation erstmals bei klinischen Kontrolluntersuchungen (> 2 Monate nach abgelaufener Borrelieninfektion) untersucht. Bei 13/37 Kindern fanden Kontrolluntersuchungen der zellulären Immunantwort auf Borrelia-Antigene statt. Die erste Kontrolle erfolgte nach

2 Wochen bis 6 Monaten (durchschnittlich 3 Monate). Bei 2/37 Kindern fanden weitere Verlaufskontrollen der Lymphoproliferation statt. Daten und Befunde aller untersuchter Patienten sind in tabellarischer Form im Anhang aufgeführt (Tabellen I-VI).

3.1.2 Kontrollen

Die Kontrollpatienten wurden anhand folgender Kriterien ausgewählt:

Einverständnis der Eltern und der Patienten,

Blutentnahme im Rahmen einer diagnostischen Routineuntersuchung,

Klinischer und serologischer Ausschluß einer akuten bzw. stattgehabten Borrelien-Infektion,

Alter ≤ 11 Jahre,

Ausschluß von Immundefekt-Erkrankungen,

keine Einnahme immunsupprimierender oder -modulierender Medikamente.

Für die Kontrolluntersuchungen konnte Blut von 5 Knaben und 13 Mädchen im Alter von 1 bis 11 (durchschnittlich 7,5) Jahren, analysiert werden:

5/18 Kinder waren gesund,

6/18 Kinder hatten akute oder chronische entzündliche bzw. infektiöse Erkrankungen,

2/18 Kinder litten an sonstigen Erkrankungen.

5/18 Kindern litten an einer idiopathischen Fazialisparese, eine Borrelien-Infektion wurde anhand von Serum- und Liquoruntersuchungen ausgeschlossen.

Bei einem Kind war anamnestisch ein Zeckenstich eruierbar (KB), jedoch ließen sich keine Borrelien-spezifischen Serum-Antikörper nachweisen. Eine Infektion mit *B. burgdorferi* wurde in diesem Fall durch eine weitere unauffällige serologische Kontrolluntersuchung nach 2 Wochen ausgeschlossen. Eine Auflistung der Kontrollpatienten ist im Anhang zu finden.

3.1.3 Etablierung der Lymphoproliferations-Assays

Für Vorversuche zur Versuchsoptimierung wurde neben dem Blut von oben beschriebenen Patienten und Kontrollen noch Blut von 2 gesunden, seronegativen Erwachsenen und 3 seronegativen Jugendlichen im Alter von 12 - 15 Jahren untersucht.

3.2 Serologische Untersuchungen

Insgesamt wurden die Seren von 54 Kindern mit Lyme-Borreliose, davon 31 im Verlauf mehrfach, und von 18 Kontrollen untersucht. Es wurden nur Patienten ausgewertet, deren serologische Untersuchungen im Referenzlabor für Lyme-Borreliose, Leitung Prof. Dr. B. Wilske, Max-von-Pettenkofer-Institut, München, durchgeführt wurden. 48/54 Patienten wurden zum Zeitpunkt der Diagnose erstmals untersucht. Die Seren der Patienten wurden im Rahmen der Routinediagnostik entnommen und zunächst auf Borrelien-spezifische Antikörper mittels IgG- und IgM-ELISA (B. afzelii-Lysat, Stamm pKo) gescreent. Die IgM-ELISAs wurden mit einem μ -capture-Test durchgeführt, hierfür wurden die Seren mit RF-Absorbens vorbehandelt. (Wilske et al. 1991). Positive und grenzwertige Ergebnisse wurden durch Immunfluoreszenz- (nach Preabsorption mit Treponema phagedenis) und Immunoblot-Analyse bestätigt (Wilske et al. 1991). Die Testsysteme und Grenzwerte sind in den Tabelle 2a und b dargestellt:

Tabelle 2a: Lyme-Serologie - Grenzwerte für ELISA- und IFT-Suchtests (Wilske et al. 1991).

	ELISA (B. afzelii)		IFT (B. afzelii)	
	IgM (OD)	IgG (U/ml)	IgM	IgG
Positiv	$\geq 0,5$	≥ 10	$\geq 1:32$	$\geq 1:64$
Grenzwertig	0,25 – 0,5	5 - 10	1:16	1:32

Tabelle 2b: Lyme-Serologie - Antigene und Grenzwerte des Immunoblot-Bestätigungstest.

	rekombinante Immunoblot – Antigene	Positiv
IgM	p41i/pBi, p41i/pKo, OspC, p39, p100	Mind. 2 Banden +, oder OspC ++
IgG	p41i/pBi, p41i/pKo, OspC, p39, p100, Osp17, p58	Mindestens 2 Banden +

3.3 Material und Methoden

3.3.1 Reagentien

Antigene und Reagentien für Lymphoproliferations Assays:

Alle Borrelien-spezifischen Antigene wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. B. Wilske, Max-von-Pettenkofer-Institut, LMU München, zur Verfügung gestellt. Verwen-

det wurde sonifiziertes Bakterienlysat von ganzen *B. burgdorferi*-Borrelien der Spezies *B. garinii* (Stamm pBi) und *B. afzelii* (Stamm pKo), sowie mehrere rekombinante *Borrelia*-Strukturproteine:

Alle rekombinanten Antigene wurden aus dem Stamm pKo (*B. afzelii*) generiert und waren identisch mit den Antigenen, die für die serologischen Routineuntersuchungen im Immunoblot verwendet wurden. Die Antigene waren endotoxinfrei und lagen in folgenden Ausgangskonzentrationen vor: OspC (Klon 1207) 1,47 mg/ml, Osp17 (Klon 1107) 1,48 mg/ml, p41i (Klon 1403) 1,2 mg/ml und p39 (Klon 1611) 0,9 mg/ml (Wilske et al. 1994, Wilske et al. 1999, Jauris-Heipke et al. 1999). Tetanustoxoid wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Hungerer, Firma Chiron-Behring, Marburg, in einer Konzentration von 2.050 Lf/ml zur Verfügung gestellt. Folgende Reagentien wurden verwendet: RPMI 1640 Medium, MEM Medium, L-Glutamin, Hepes-Puffer, Penicillin, Streptomycin (alle Whittaker, Walkersville, MD); Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Piscataway, NJ), Rekombinantes human-IL-12, α IL-12 neutralisierende Antikörper aus der Ziege und rekombinantes human-IL-4 (alle R&D Systems, Minneapolis, MN). Die Lymphoproliferations-Assays wurden in 96-well Rundboden-Platten der Firma Fisher Scientific, Pittsburg, angelegt. Zytokin-ELISA: Quantikine Human IL-10 Immunoassay Kit, Quantikine IFN γ Kit und Quantikine HS Human IL-4 Immunoassay Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN). FACS-Analysen: IMK plus Simultest (Becton Dickinson, San Jose CA), PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺).

3.3.2 Isolierung der blutmononukleären Zellen (PBMC)

Heparinisiertes Vollblut (ca. 50 μ l Na-Heparinat/ml Blut) wurde innerhalb von 24 h nach der Blutentnahme für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Serum wurde anschließend im Wasserbad bei 56° C für 30 Min. hitzeinaktiviert und nach dem Abkühlen nochmals für 10 Min. bei 3000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde als autologes Serum für das Kulturmedium der T-Zell-Kulturen verwendet (Kapitel 3.3.3.2 Vorversuche). Der Blutkuchen wurde 1:1 mit MEM Medium (+ 25 mM Hepes-Puffer) aufgeschwemmt und über Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation über 20 Min. bei 2000 rpm zentrifugiert. Die so isolierten mononukleären Zellen (PBMC) wurden mit MEM 3 mal gewaschen und bei 1500 rpm abzentrifugiert. Die gereinigten PBMC wurden in 1 ml Zellkultur-Medium (RPMI 1640 mit 4 mM L-Glutamin, 500 U/L Penicillin, 500 μ g/L Streptomycin, 25 mM Hepes und 10% autologes Serum)

resuspendiert und ausgezählt. Durchschnittlich konnten $4,2 \times 10^6$ PBMC gewonnen werden, die noch am selben Tag in Lymphoproliferations Assays verarbeitet wurden.

3.3.3 Lymphoproliferations Assays

Die Lymphoproliferations Assays wurden mit leichten Modifikationen, wie vormals beschrieben, angelegt (Weir et al. 1978, Dressler et al. 1991, Hafler und Pohl-Koppe 1998).

PBMC von Patienten und Kontrollen wurden in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/well in 200 μ l/well Kulturmedium (s.o.) auf 96-well Platten aufgebracht und in jeweils 4-facher Ausführung mit folgenden Antigenen stimuliert: Lysate von *B. afzelii* (Stamm pKo) und *B. garinii* (Stamm pBi) in einer Konzentration von 10 μ g/ml; die rekombinanten Proteine OspC, Osp17, p41 und p39 in einer Konzentration von 50 μ g/ml. Als Negativkontrolle wurden je 4 wells ohne Antigen angelegt, als Positivkontrolle wurde Tetanustoxoid (TT) in einer Konzentration von 12,5 Lf/ml verwendet (Kapitel 3.3.3.2, Antigentitrationen). Parallel zur primären Stimulation mit Antigenen konnten von 7 Kindern folgendermaßen modifizierte Assays angelegt werden: Zusätzlich zu den jeweiligen Antigenen in o.g. Konzentration wurde rhIL-12 (10 ng/ml) oder anti-IL-12-AK (2 μ g/ml) zur Modulation von Proliferation und Zytokinsekretion zugefügt und in je 4 wells mit 5×10^4 PBMC pro Kondition ausgesät. Die PBMC wurden für 5 Tage bei 37° C im Zellinkubator (5%CO₂ 100% Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Nach 5 Tagen wurden von je 2 wells einer Bedingung die Zellkulturüberstände abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung (Messung der Zytokinsekretion) bei – 80° C eingefroren. Zu den jeweils verbleibenden 2 wells wurde ³H-Thymidin (Stammlösung: 1mCi/ml in einer Verdünnung von 1:60 mit RPMI Medium 1640) in einer Endkonzentration von 5% gegeben. Nach weiteren 18 - 24 Stunden Inkubation wurden die PBMC mit Zell-Harvester auf Spezialfilterpapier gesaugt. Nach dem Trocknen wurde 5 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben. Die Radioaktivität, die dem inkorporierten ³H-Thymidin entsprach, wurde im Betacounter als counts per minute (cpm) gemessen. Es wurde jeweils der Mittelwert aus 2 Messungen gewertet. Zur Beurteilung der Proliferationen wurde einerseits der Δ cpm-Wert errechnet: **Δ cpm = cpm (stimuliert) – cpm (Negativkontrolle)**, andererseits wurde der Stimulationsindex (SI) ermittelt: **SI = cpm (stimuliert) / cpm (Negativkontrolle)**. Als positiv galt ein Δ cpm > 1.000 bzw. ein SI > 3,0.

3.3.3.1 Negativ- und Positivkontrollen

Die einzelnen Assays wurden nur dann gewertet, wenn in der Negativkontrolle (Medium ohne Antigenzusatz) ein cpm-Wert von < 1.000 gemessen wurde und gleichzeitig die Positivkontrolle (TT) einen Wert von > 1.000 cpm erreichte, bzw. wenn sich für die Positivkontrolle mit TT ein SI $> 3,0$ berechnen ließ.

3.3.3.2 Vorversuche zur Etablierung der Lymphoproliferations-Assays

Zusammensetzung des Zellkultur-Mediums: Um für die Lymphozytenstimulations-Assays die optimale Serum-Konzentration des Nährmediums zu ermitteln, wurden $2,5 \times 10^5$ PBMC/ml von 3 Patienten mit B. afzelii-Lysat und TT stimuliert. Diese wurden in Kulturmedien unterschiedlicher Serum-Zusammensetzung eingebracht und einer Konzentration von 5×10^4 PBMC/well ausgesät. Die Kulturmedien enthielten jeweils RPMI 1640 Nährmedium und 10% autologes Serum (AS), 5% AS, 5% AS + 5% gepooltes Humanserum (PHS) bzw. 10% PHS. Nach 6 Tagen wurde die ^3H -Thymidin-Inkorporation gemessen.

Antigentitrationen: Jeweils $2,5 \times 10^5$ PBMC/ml von einem Patienten und 2 Kontrollen wurden in den Konzentrationen 1 – 10 – 25 – 50 μg (Antigen)/ml mit den Lysat-Antigenen pBi (B. garinii) bzw. pKo (B. afzelii) stimuliert. Ebenso wurden Antigen-Titrationen zu den rekombinanten Proteinen OspC, Osp17, p39 und p41 angelegt: $2,5 \times 10^5$ PBMC/ml von verschiedenen Patienten und Kontrollen wurden mit OspC, Osp17, p39 und p41 in folgenden Konzentrationen stimuliert: 1 – 10 – 50 – 100 – 200 μg (Antigen)/ml. Außerdem wurden $2,5 \times 10^5$ PBMC/ml von 2 Patienten und einer Kontrolle mit TT in folgenden Konzentrationen stimuliert: 3,12 – 6,25 – 12,5 – 25 – 50 Lf/ml. Nach jeweils 6 Tagen wurde die ^3H -Thymidin-Inkorporation gemessen.

Ermittlung der optimalen Kulturdauer: $2,5 \times 10^5$ PBMC/ml von 2 seronegativen Patienten wurden mit B. afzelii-Lysat (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), rekombinantem OspC (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Tetanustoxoid (12,5 Lf/ml) stimuliert. Nach 4, 5, 6, 7 bzw. 8 Tagen wurde die Proliferation mittels ^3H -Thymidin Markierung ermittelt.

3.3.4 FACS-Analysen

Zu Bestimmung der vorherrschenden Lymphozyten-Subpopulationen der Lymphozytenstimulationen wurde parallel zu den Lymphozytenstimulations-Assays von 2 Patienten (CAS, JHA) und 2 Kontrollen (AM, CS) die jeweilig bestehende

Lymphozyten-Subpopulationen mittels direkter doppelter Immunfluoreszenz in der Durchflußzytometrie am Tag der Blutentnahme (Tag 0) und nach Stimulation (Tag 6) untersucht. Für die Oberflächenfärbung stand ein kommerziell erhältlicher Testkit (IMK plus Simultest) bestehend aus 6 Antikörperlösungen mit monoklonalen Antikörpern zur Verfügung: Reagens A: FITC-markierte anti-CD45 Antikörper (Leukozyten) und PE-markierte anti-CD14 Antikörper (Monozyten); Reagens B: Isotypen Kontrolle zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz mit murinen, monoklonalen FITC-markierten IgG1 und PE-markierten IgG2a Antikörpern; Reagens C: FITC-markierte anti-CD3 Antikörper (T-Lymphozyten) und PE-markierte anti-CD19 Antikörper (B-Lymphozyten); Reagens D: FITC-markierte anti CD4 Antikörper (T-Helfer Lymphozyten) und PE-markierte anti-CD8 Antikörper (T-Suppressor Lymphozyten); Reagens E: FITC-markierte anti-CD3 Antikörper und PE-markierte anti-HLA-DR Antikörper (aktivierte T-Lymphozyten); Reagens F: FITC markierte anti-CD3 Antikörper (Lymphozyten) und PE markierte anti-CD16 plus anti-CD56 Antikörper (NK „natural killer“ Zellen).

Die PBMC wurden isoliert (s.o.), ausgezählt und in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Davon wurden 6×10^5 Zellen sofort analysiert (Tag 0), die verbleibenden PBMC wurden mit *B. afzelii*-Lysat (PKo), OspC, TT und ohne Antigen (Negativkontrolle), jeweils in 6-facher Ausführung, in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/well in 200 µl Zellkulturmedium inkubiert und an Tag 6 untersucht. Für jeden Oberflächenmarker wurden je 1×10^5 Zellen mit PBS ad 50 µl aufgefüllt und mit 10 µl der jeweiligen Antikörperlösung für 15 Min. bei 21° C im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde mit 2 ml PBS aufgefüllt und für 10 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert. Die Analyse wurde mittels Durchflußzytometer (Becton Dickinson, CA, USA) und dem Programm Cell Quest (Microsoft) durchgeführt.

3.3.5 Messung der Zytokin-Sekretion im Zellkulturüberstand

Von 23 Patienten und 2 Kontrollen wurde die Sekretion von IFN- γ , IL-10 und IL-4 im Zellkulturüberstand (ZKÜ) der Lymphozyten-Proliferationen nach Antigen-Stimulation gemessen. Die PBMC wurden jeweils in Duplikation nur mit Medium, mit *B. garinii*, *B. afzelii*, OspC oder TT stimuliert. Am Tag 5 wurden die ZKÜ abgenommen und bei -80° C eingefroren. Am Tag der Zytokin-Messung wurden die Proben aufgetaut und mittels Zytokin-ELISA auf Sekretion von IL-10, IL-4 und IFN- γ getestet. Die ELISAs wurden nach Hersteller-Anweisung durchgeführt: Zunächst wurden die jeweiligen

Verdünnungsreihen der Standards für IL-10, IL-4 und IFN- γ hergestellt. In dem Hersteller mit murinen, monoklonalen Antikörpern gegen Zytokin (IL-10, IL-4 bzw. IFN- γ) beschichteten 96-well Mikrotiterplatten wurden je 50 μ l/well der entsprechenden Verdünnungslösung vorgelegt. Pro Well wurden 200 μ l der Standardverdünnungen bzw. der Proben aufgetragen und bei Raumtemperatur für die vorgeschriebene Zeit inkubiert (IL-10: 2 Stunden; IL-4: 3 Stunden; IFN- γ : 2,5 Stunden). Jeder Ansatz wurde in doppelter Ausführung angelegt. Anschließend wurden die Wells abgesaugt, 4 mal gewaschen, je 200 μ l/well der entsprechenden Konjugat-Lösung (Für IL-10 und IFN- γ : Peroxidase-gebundene bzw. für IL-4: alkalische Phosphatase-gebundene polyklonale Antikörper gegen das zu bestimmende Zytokin) aufgetragen und bei Raumtemperatur inkubiert (IL-10: 1 Stunde; IL-4: 2 Stunden; IFN- γ : 2 Stunden). Vor der Zugabe von 200 μ l/well der jeweiligen Substratlösung wurde erneut 4 mal gewaschen. Beim IL-4-Assay wurde zusätzlich nach einer Stunde 50 μ l/well Verstärker-Lösung (ADH-Diaphorase-Redox-System mit Formazan als Endprodukt) zugefügt. Nach Ablauf der Inkubation (IL-10: 30 Minuten; IL-4: 30 Minuten; IFN- γ : 20 Minuten) wurden die Reaktionen mit 50 μ l/well 2N Schwefelsäure gestoppt. Anschließend wurden die IL-10- bzw. IFN- γ -Platten bei 450 nm und die IL-4-Platten bei 490 nm im ELISA-Reader gelesen. Von den errechneten Mittelwerten wurde der Leerwert abgezogen. Die Sensitivität der Assays lag für IFN- γ bei $< 3,0$ pg/ml, für IL-10 bei $< 1,5$ pg/ml und für IL-4 bei $< 0,13$ pg/ml. Für die Auswertung wurden Δ -Werte gebildet, wobei die Durchschnittswerte der unstimulierten Zellen von den Durchschnittswerten der Antigen-stimulierten PBMC abgezogen wurden. Als positive Zytokinsekretion wurden für IFN- γ Δ -Werte > 50 pg/ml, für IL-10 Δ -Werte > 25 pg/ml und für IL-4 > 10 pg/ml gewertet.

3.3.6 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm "Excel" der Firma Microsoft durchgeführt.

Zur Berechnung von Wahrscheinlichkeiten wurde der Student-t-Test verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Serologische Untersuchungen

4.1.1 Serologie zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

Von 49/54 Patienten konnten serologische Daten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose erhoben werden.

4/49 Kinder hatten ein Erythema migrans (EM): Bei 2/4 Kindern waren keine Antikörper im Serum nachweisbar (FP und AH), 2/4 Kinder hatten sowohl IgM-, als auch IgG-Antikörper im Serum (PS und MAS).

1/49 Kind hatte mEM (DM): Die IgM-AK waren deutlich, die IgG-AK schwach positiv.

7/49 Kinder hatten ein Lymphozytom (BL): Davon hatte 1 Kind nur IgM-AK (CAS). 4/7 Kinder wiesen deutlich positive IgG-AK auf: Der durchschnittliche IgG-Serum-Titer war 244 ± 90 (Standardabweichung) U/ml. 1 Kind hatte nur einen grenzwertigen IgG-Titer von 6 U/ml, jedoch keine IgM-AK (Patient AP) und 1 Kind war seronegativ (Patient CC).

32/49 Kinder hatten eine Neuroborreliose (NB): 3/32 Kinder (9,4%) waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose seronegativ (AHI, EH und RA). 4/32 Kinder (12,5%) waren IgG-AK negativ bei grenzwertig-positivem IgM (JR, NJ, IZ mit FP und KF mit aM/FP). 10/32 Kinder (31,3%) hatten eindeutig positive IgM-Titer ($\overline{\text{OD}} = 1,098 \pm 0,383$) und waren IgG-negativ. 4/32 Kinder (12,5%) hatten deutlich positive IgM ($\overline{\text{OD}} = 1,481 \pm 0,477$) bei grenzwertigem IgG. 10/32 Kinder (31,3%) hatten sowohl IgM- ($\overline{\text{OD}} = 1,068 \pm 0,466$), als auch IgG-AK ($\overline{\text{U/ml}} = 51 \pm 48$). Insgesamt hatten 89,6% (28/32) der Patienten mit NB bei Diagnosestellung grenzwertig oder deutlich positive IgM-AK. Nur 1 Kind mit NB hatte positive IgG-AK und war IgM-negativ: Patient MZ mit chronischen Kopfschmerzen.

5/49 Kinder hatten eine Lyme-Arthritis (LA) und wiesen alle deutlich erhöhte IgG-Titer auf ($\overline{\text{U/ml}} = 438 \pm 96$), 2/5 Kinder hatte zusätzlich schwach-positive IgM-AK (DZ und DR), 3/5 Kinder waren IgM-negativ (Tabelle 3; Abbildung 1).

Tabelle 3: Lyme Serologie zum Zeitpunkt der Erstdiagnose: 49/54 Kinder mit Lyme-Borreliose konnten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung auf Serumantikörper untersucht werden:

- G-/M-: 6/49 Kinder wiesen weder IgM- noch IgG-Antikörper (ELISA) im Serum auf: Davon hatten 2 ein EM (FP und AH), 1 Kind litt an einem BL (CC) und 3 Kinder hatten eine NB (RA mit FP und EM, AH mit FP, EH mit aM/PMR und EM). 5/6 Kinder hatten eine positive Zeckenstich-Anamnese. Die Inkubationszeit lag zwischen 2 Tagen und 6 Wochen.
- M+/G-: 10/49 Kinder hatten zum Zeitpunkt der Diagnose ausschließlich IgM-Antikörper: 1 Kind hatte ein BL, 8 Kinder waren an einer NB erkrankt. Bei 3/9 Kindern war ein Zeckenstich erinnerlich, der zwischen 2 und 4 Wochen zurück lag.
- G+/M+: 18/49 Kinder hatten sowohl IgM-, als auch IgG-Serumantikörper: 2 Kinder waren an einem EM erkrankt, 14 Kinder hatten eine NB und 2 litten an einer LA. Ein Zeckenstich war in 7/18 Fällen erinnerlich und lag 2 – 12, im Durchschnitt 4,5 Wochen vor Diagnosestellung zurück.
- G+/M-: 8/49 Kinder hatten zum Diagnosezeitpunkt keine nachweisbaren IgM-Antikörper, wiesen jedoch alle einen deutlich erhöhten IgG-Titer > 100 (OD) auf. 3 Kinder hatten ein BL, 1 Kind hatte chronische Kopfschmerzen und neurologischen Beschwerden im Sinne einer NB (MZ), 3 Kinder waren an einer LA erkrankt. Ein Zeckenstich war bei 6/7 Kindern erinnerlich, und es ergab sich daraus eine durchschnittliche Inkubationszeit im Bereich von mehreren Monaten.
- Grenzwertige Befunde: Nicht eindeutige serologische Ergebnisse wiesen 6/49 Kinder auf: 5 Kinder hatten grenzwertige IgM-, jedoch keine IgG- Antikörper. 4/5 dieser Kinder litten an einer Neuroborreliose: JR, NJ und IZ mit isolierter FP; KF mit FP und aM. Ein Kind hatte ein EM. Alle 5 Kinder hatten negative IgG-IFT ($\leq 1:16$), 1 Kind hatte grenzwertig positive IgM-IFT von 1:32 (IZ). Ein Kind hatte eine Zeckenstich-Anamnese. Ein weiterer Patient (A) mit EM und BL) wies grenzwertig positive IgG-Antikörper auf bei negativem IgM.

Diagnose	Ø AK im Serum ± Stabw (ELISA)			M-/G-	M+/G-	M+/G+			M-/G+	Grenzwertige Befunde				
	(n)	IgM (OD)	IgG (U/ml)	(n)	(n)	IgM ØOD ± Stabw	(n)	IgM ØOD ± Stabw	IgG ØU/ml ± Stabw	(n)	IgG ØU/ml ± Stabw	(n)	IgM ØOD ± Stabw	IgG U/ml
EM	(5)	1,669 ± 0,978	18 ± 6	(2)	(0)	.	(2)	1,669 ± 0,978	18 ± 6	(0)	.	(1)	0,302	.
BL	(7)	0,489 ± 0,139	184 ± 129	(1)	(1)	0,682	(0)	.	.	(4)	199 ± 110	(1)	0	6
NB	(32)	1,100 ± 0,444	57 ± 67	(3)	(10)	1,089 ± 0,383	(14)	1,186 ± 0,505	54 ± 68	(1)	98	(4)	0,419 ± 0,046	0
LA	(5)	0,478 ± 0,113	438 ± 96	(0)	(0)	.	(2)	0,478 ± 0,113	595 ± 85	(3)	400 ± 83	(0)	.	.

G, M = IgG- bzw. IgM-Antikörper (ELISA). + = positiv, - = negativ. Stabw = Standardabweichung. ØOD = Durchschnittliche optische Dichte im ELISA.

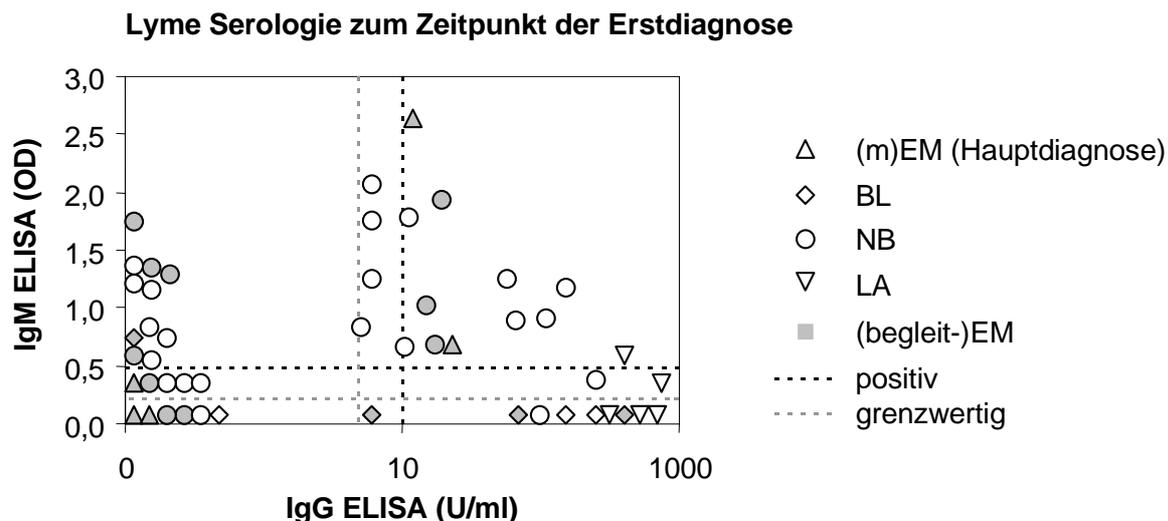


Abbildung 1: Lyme Serologie (ELISA) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.
 IgG, IgM = IgG- bzw. IgM-Serum-Antikörper (ELISA), OD = Optische Dichte im ELISA

Durchschnittliche IgM- und IgG-Titer bei verschiedenen Manifestationen der LB zum Zeitpunkt der Erstdiagnose:

Der durchschnittliche IgM-Titer bei Kindern mit EM lag bei $1,669 \pm 0,978$ OD, bei Kindern mit BL bei $0,489 \pm 0,139$ OD, bei Kindern mit NB bei $1,100 \pm 0,444$ OD und bei Kindern mit LA bei $0,478 \pm 0,113$ OD. Der durchschnittliche IgG-Titer von Kindern mit EM war 18 ± 6 U/ml, von Kindern mit BL 184 ± 129 U/ml, von Kindern mit NB 57 ± 67 U/ml und von Kindern mit LA 438 ± 96 U/ml (Tabelle 3).

Bei Patienten mit EM bzw. NB konnten insgesamt signifikant höhere IgM-AK ($1,182 \pm 0,534$ OD) nachgewiesen werden, als bei Patienten mit BL bzw. LA ($0,483 \pm 0,127$ OD; $p = 0,0001$). Im Gegensatz dazu wiesen Patienten mit BL bzw. LA signifikant höhere durchschnittliche IgG-AK (325 ± 168 U/ml) auf, als Patienten mit (m)EM bzw. NB (52 ± 64 U/ml; $p = 0,0016$).

Durchschnittliche IgM- und IgG-Titer bei Kindern mit LB mit bzw. ohne EM:

Von den zum Zeitpunkt der Erstdiagnose untersuchten 49 Kindern mit Lyme-Borreliose war bei insgesamt 18 Kindern (36,7%) ein EM aufgetreten: 4/18 Kinder hatten ein isoliertes EM, bei 1/18 Kind wurden multiple EM diagnostiziert und bei 13/18 Kindern war ein EM zeitnah zu einer anderen Manifestation der LB auf (krankheitsbegleitend) aufgetreten. Bei 31/49 Kindern (63,3%) war bei Diagnosestellung kein EM in der unmittelbaren Anamnese eruierbar.

Bei 22/31 Kindern ohne EM (71,0%) und 12/18 Kindern mit EM (66,7%) konnten IgM-Antikörper im Serum nachgewiesen werden. Die durchschnittlichen IgM-Titer beider Gruppen unterschieden sich nicht signifikant ($\bar{O}D$ ohne EM = $0,907 \pm 0,528$; $\bar{O}D$ mit EM = $1,151 \pm 0,655$; $p = 0,30$).

8/18 Kinder mit EM (44,4%) und 19/31 Kinder ohne EM (61,3%) bildeten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose IgG-AK. Patienten ohne zeitnah zur Diagnosestellung aufgetretenes EM bildeten signifikant höhere IgG-Titer, als Patienten, die ein EM hatten ($\bar{O}U/ml$ ohne EM = 194 ± 178 ; $\bar{O}U/ml$ mit EM = 20 ± 17 ; $p < 0,001$. Abbildung 1, Tabelle 4).

Tabelle 4: Durchschnittliche IgM- und IgG-Antikörpertiter bei Patienten mit akuter Borreliose mit bzw. ohne (krankheitsbegleitendes) EM

	EM	kein EM
n gesamt	18	31
\bar{O} IgM (OD)	$1,151 \pm 0,655$	$0,907 \pm 0,528$
\bar{O} IgG (U/ml)	20 ± 17	194 ± 178

Von 18 bzw. 31 pädiatrischen Patienten mit akuter Lyme-Borreliose mit bzw. ohne (zeitnah aufgetretenes) EM wurden die IgM- und IgG-Antikörpertiter der jeweils positiven Patienten im Serum verglichen.

Durchschnittliche Höhe der IgM-Titer bei Kindern mit bzw. ohne IgG-Antikörperbildung: Kinder, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits IgG-AK bildeten, hatten signifikant höhere IgM-Titer, als diejenigen, die nur IgM-AK bildeten ($1,164 \pm 0,604$ OD vs. $0,721 \pm 0,360$ OD, $p = 0,014$; Tabelle 5).

Tabelle 5: Durchschnittliche IgM-Antikörpertiter bei pädiatrischen Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose mit bzw. ohne nachweisbare IgG-AK

Durchschnittliche IgM-Titer bei Erstdiagnose	
Bei vorhandener IgG-Bildung (n=18)	Bei fehlender IgG-Bildung (n=16)
\bar{O} IgM (OD) \pm Stabw	\bar{O} IgM (OD) \pm Stabw
$1,164 \pm 0,604$	$0,721 \pm 0,360$

Von 49 pädiatrischen Patienten mit akuter Lyme-Borreliose Stadium I und II wurden die IgM-Antikörpertiter im Serum zum Zeitpunkt der Erstdiagnose verglichen. 6/49 Kinder waren seronegativ, 9/49 Kinder bildeten nur IgG-AK. Bei 18/49 Kindern waren sowohl IgG- als auch IgM-AK nachweisbar, 16/49 Kinder bildeten ausschließlich IgM; $p = 0,014$.

4.1.2 Serologische Verläufe

29/54 Patienten konnten im Verlauf untersucht werden. Die Titer-Verläufe der Borrelien-spezifischen IgM- und IgG-Antikörper (ELISA) im Serum dieser 29 Kinder waren sehr unterschiedlich, jedoch konnten die Patienten anhand von Analogien ihrer Titer-Verläufe in verschiedene Gruppen eingeteilt werden:

Deutlich erhöhte IgG-AK (> 100 U/ml):

8/29 Kinder hatten deutlich erhöhte IgG-Titer, zwischen 150 und 490 (\bar{x} = 348 \pm 133) U/ml bei Erstdiagnose, die sich im Verlauf wenig veränderten: Mittelwert der Kontroll-Serologien: 394 \pm 303 U/ml.

5/8 Kinder hatten bei Diagnosestellung keine IgM-AK (mehr) nachweisbar.

2/8 Kinder hatten zunächst grenzwertige, später negative IgM.

1/8 Kinder hatte einen deutlich sinkenden IgM-Titer.

Die erste Nachuntersuchung fand nach 1 bis 6 Monaten, die letzte Kontrolle nach bis zu 3 Jahren statt (Abbildung 2a). Alle Kinder waren an einer akuten, systemischen Lyme-Borreliose (Stadium II) erkrankt:

2/8 Kinder hatten ein BL ohne begleit-EM,

2/8 Kinder hatte eine NB (IB mit Meningoradikulitis, MP mit aM),

4/8 Kinder litten an einer Lyme-Arthritis (DZ, PN, PW und SG).

Soweit ein Zeckenstich rememberlich war, ließ sich eine durchschnittliche Inkubationszeit von ca. 3 (1 bis 12) Monaten ermitteln.

Grenzwertige (5-10 U/ml) bzw. mäßig erhöhte IgG-AK (10-100 U/ml):

Zu dieser Gruppe wurden 9/29 Patienten gezählt. Alle Patienten litten an einer akuten, systemischen Borreliose, die IgM-AK waren uneinheitlich:

3/9 Kinder hatten kutane Manifestationen: DM mit mEM, UB und AP mit EM/BL,

6/9 Kinder hatten eine NB, davon 2 mit FP (SST mit EM und MER ohne EM), 3 Kinder hatten eine aM (JHA, PLC und LM mit FP),

1/9 Kind litt unter sonstigen neurologischen Beschwerden (MS).

Es ließ sich in dieser Gruppe beobachten, daß beide Kinder mit BL und EM keine IgM-AK bildeten. 5/9 Kinder mit zunächst deutlichem IgM-Titer waren bei der Kontrolle IgM negativ oder grenzwertig. 2/9 Kinder hatten bleibend hohe IgM-Titer (SST und JHA, Abbildung 2b). Sofern ein Zeckenstich rememberlich war, lag er vom Diagnosezeitpunkt

3 - 12 Wochen, im Durchschnitt 8 Wochen, zurück.

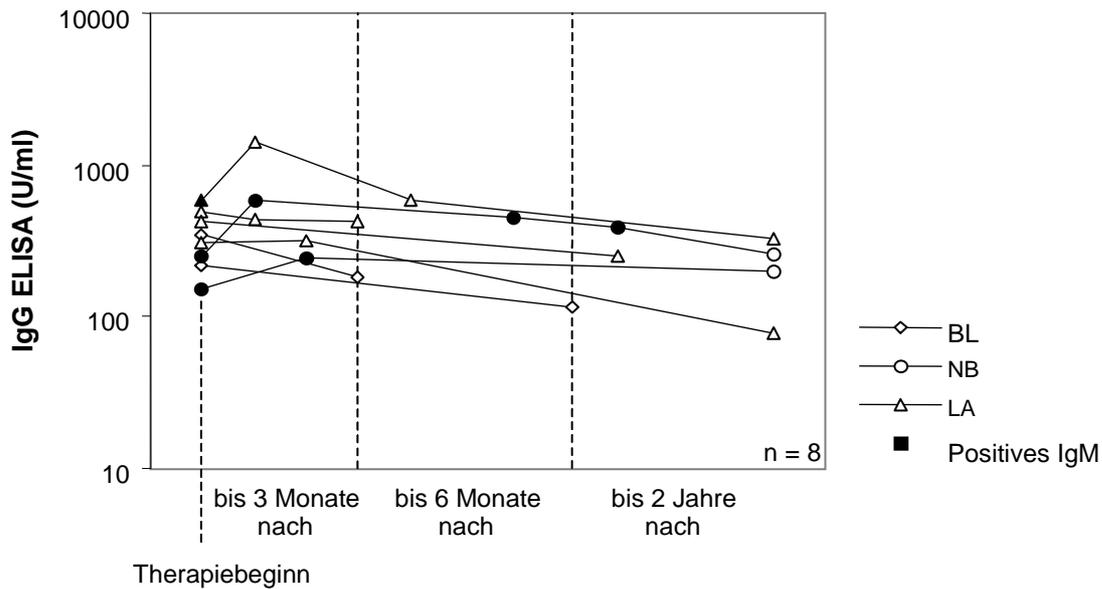


Abbildung 2a: IgG-Titer-Verlauf (ELISA) bei hohem IgG-Ausgangswert (>100 U/ml). Titer-Verläufe von 8 Patienten mit akuter systemischer Lyme-Borreliose.

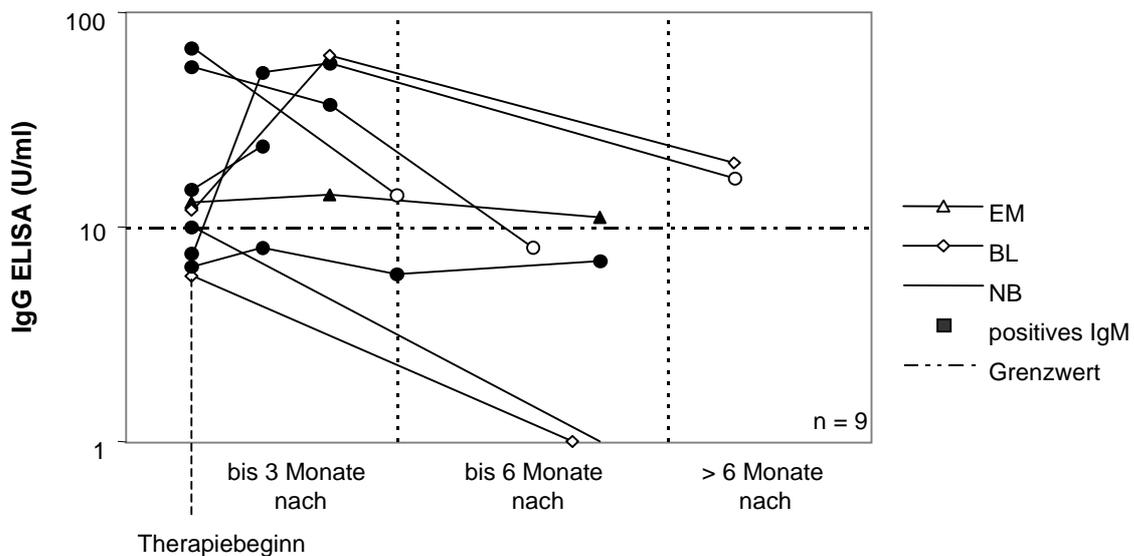


Abbildung 2b: IgG-Titer-Verlauf (ELISA) bei niedrigem IgG-Ausgangswert (<100 U/ml). Darstellung der Titer-Verläufe von 9 Patienten mit akuter systemischer Lyme-Borreliose.

IgM-Titerverläufe bei Serokonversion zu IgG:

Im Gegensatz zu den IgG-Nonkonvertern (s.u.) stellten sich die IgM-Titer-Verläufe bei Bildung von IgG-Antikörpern folgendermaßen dar:

Bei 6/8 Patienten mit deutlicher IgG-Antikörperbildung (> 100 U/ml) war spätestens 4 Wochen nach Therapiebeginn keine Bildung von IgM-Antikörpern im Serum mehr

nachweisbar. Bei 1/8 Patient konnten nach 4 Wochen ein deutlich sinkender IgM-Titer gemessen werden, nach ca. 1 Jahr waren keine IgM-AK mehr nachweisbar. 1/8 Kind bildete über einen Zeitraum von ca. 1 Jahr hinweg noch grenzwertig-positive IgM-Antikörper (Abbildung 3a).

2/9 Patienten mit niedrigen IgG-AK (< 100 U/ml) bildeten zu keinem Zeitpunkt IgM-AK. Beide hatten ein BL. 6/9 Patienten hatten deutlich sinkende IgM-AK, die in 4 Fällen nach 3 bis 6 Monaten negativ bzw. grenzwertig waren. Bei 1/9 Patient waren die IgM-AK nach 2 Monaten nach Therapiebeginn noch angestiegen (Abbildung 3b).

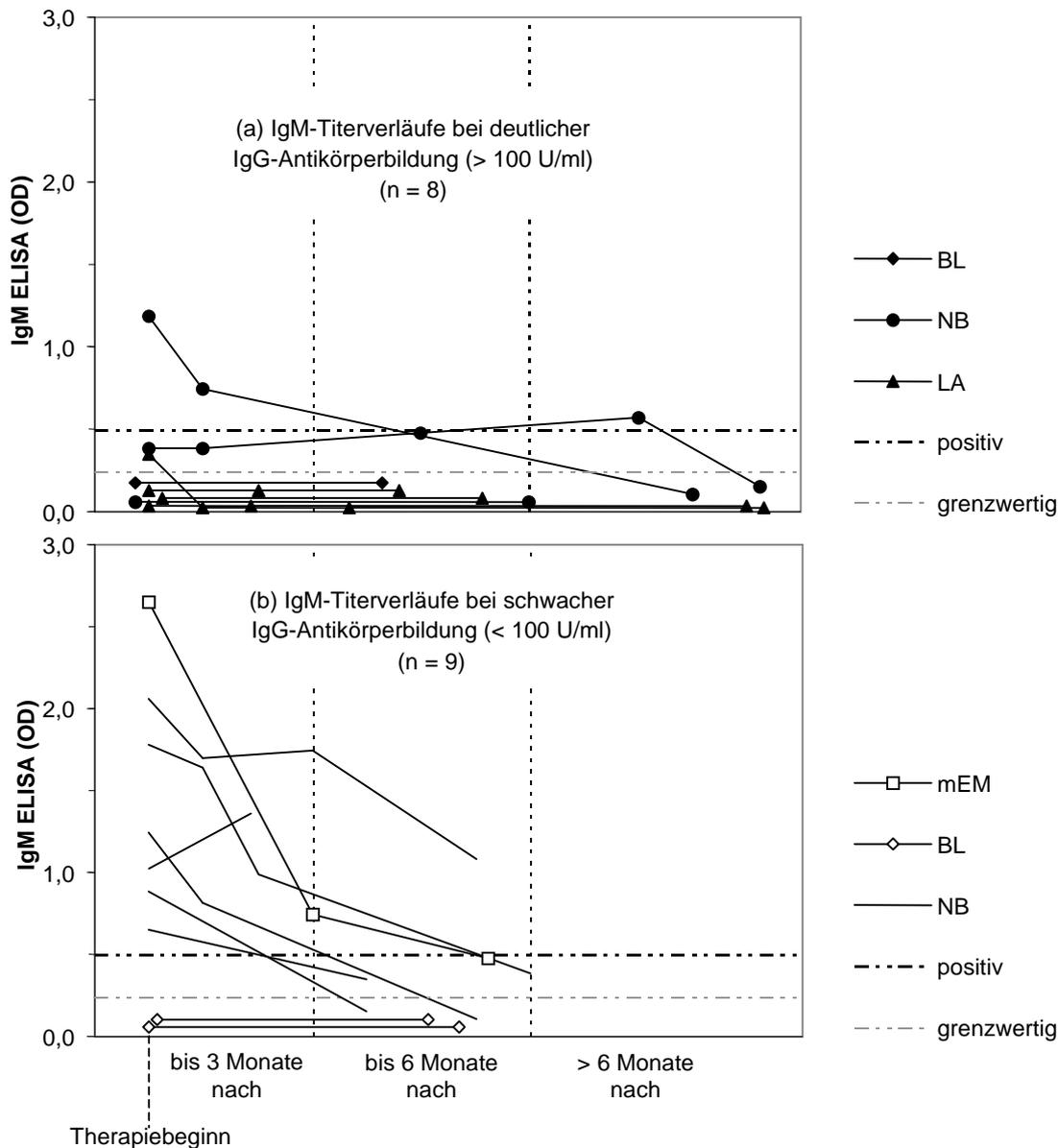


Abbildung 3 (a,b): IgM-Titerverläufe bei Patienten mit deutlicher (a) und schwacher (b) IgG-Antikörperbildung

IgM-Titerverläufe bei fehlender Serokonversion zu IgG:

Bei 11/29 Patienten konnte keine Serokonversion von IgM zu IgG beobachtet werden: 1/29 Kind hatte ein EM, 10/29 Kinder litten an einer NB, davon 4 mit begleit-EM. Die IgM-Titer-Verläufe sind in Abbildung 3c dargestellt:

- 10/11 Kindern hatten zunächst positive, oder ansteigende grenzwertige IgM-Titer, die im weiteren Verlauf aber rückläufig sind.

6/11 Kinder verloren ihre IgM-AK nach durchschnittlich 4,6 Monaten (3 - 10).

Bei 4/11 Kinder ließen sich nach 3 - 24 Monaten noch grenzwertige IgM-AK nachweisen.

1/11 Kind mit zunächst negativen IgM-AK entwickelte 2 Wochen nach Diagnosestellung nachweisbare IgM (RA mit EM/FP).

Bei 4/11 Kindern war ein Zeckenstich erinnerlich, im Durchschnitt 3,8 Wochen vor Erkrankungs- bzw. Therapiebeginn.

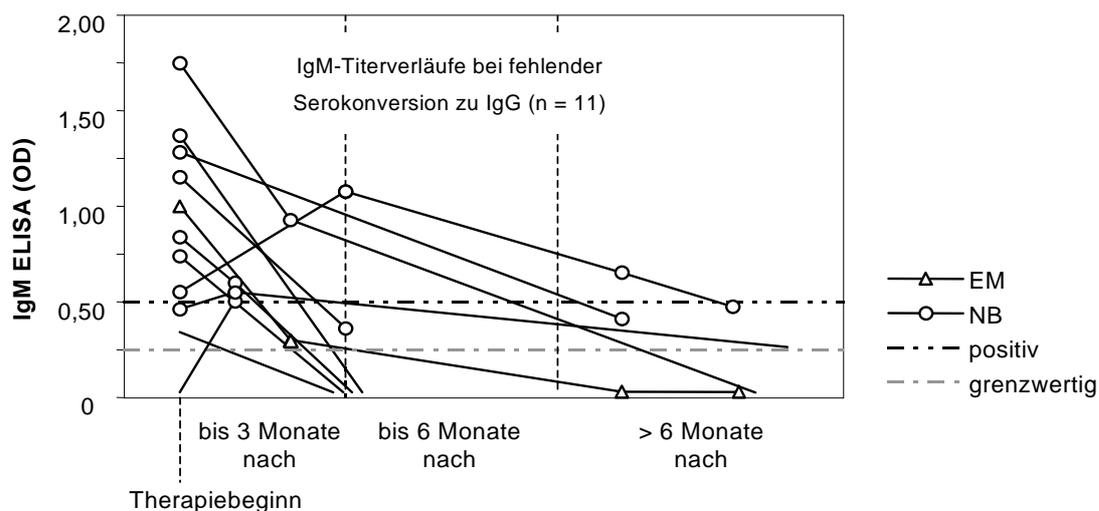


Abbildung 3c: IgM-Titer-Verlauf (ELISA) bei IgG-negativen Patienten. Darstellung der IgM-Titer-Verläufe von 11 Patienten ohne IgG-Serokonversion.

Fehlende IgM- und IgG-Antikörperbildung:

Eine Patientin von 29 (AH mit EM) blieb auch bei der Nachuntersuchung nach 4 Wochen seronegativ. Ein Zeckenstich fand 2 Wochen vor Diagnose statt.

Zusammenfassung:

Je länger die Zeit von einem erinnerlichen Zeckenstich bis zum Auftreten spezifischer Symptome war, desto deutlicher war die IgG-Antikörperbildung. Wenn zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine deutliche IgG-AK Bildung (> 100 U/ml) nachweisbar war, blieben die Titer bis zu 2 Jahre nach Therapie weiterhin deutlich erhöht. In diesen Fällen war die IgM-Antikörperbildung bei Diagnosestellung niedrig und rasch abfallend oder negativ.

Die durchschnittlichen IgM-AK waren bei vorhandener IgG-Bildung signifikant höher, als bei fehlender Serokonversion (Tabelle 5). Bei deutlicher IgG-AK-Bildung wurden jedoch signifikant niedrigere IgM-Titer ($0,522 \pm 0,300$ OD) beobachtet, als bei niedriger IgG-AK-Bildung ($\emptyset_{\text{IgM}} = 1,251 \pm 0,589$ OD; $p < 0,001$; Abbildung 3a, b).

Antikörperbildung im Verlauf in Abhängigkeit von Stadium und Diagnose:

Bei 7 Kindern mit kutanen Manifestationen wurden im Verlauf sehr unterschiedliche serologische Konstellationen beobachtet:

- EM: Bei einem (AH) von 3 Kindern mit EM waren zu keinem Zeitpunkt AK im Serum nachweisbar, bei einem weiteren waren keine IgG- und nur initial IgM-AK nachweisbar. Ein Kind mit mEM (DM) bildete über einen Zeitraum von 6 Monaten sowohl IgG, als auch IgM.
- BL: 2/4 Kindern mit BL bildeten über einen Zeitraum von > 6 Monaten hochtitrige IgG-AK bei negativen IgM-AK. Ein weiteres Kind bildete > 6 Monate niedrigtitrige IgG, jedoch keine IgM und bei einem Kind mit BL waren nur initial ausschließlich grenzwertige IgG-AK nachweisbar, nach ca. 6 Monaten war der Patient IgG- und IgM-AK negativ.

Antikörperbildung bei 18 Kindern mit Neuroborreliose: Alle 18 im Verlauf untersuchten Kinder mit Neuroborreliose waren bei Diagnosestellung IgM-AK positiv.

Fehlende IgG-Serokonversion: Bei 10/18 (55,6%) Kindern mit NB fand bis zu 6 Monate nach Therapie keine IgG-Serokonversion statt (Nonkonverter), dabei waren bei allen 10 Kindern anfangs IgM-AK nachweisbar: Die IgM-AK waren bei 4/10 Kindern nach 3 Monaten, bei einem Kind nach 6 Monaten negativ.

IgG-Serokonversion: 8/18 Kinder hatten bereits bei Diagnosestellung IgG-AK: 2/18 (11,1%) Kinder mit NB hatten initial hohe IgG-AK-Titer (>100 U/ml), die über einen Nachbeobachtungszeitraum von bis zu 2 Jahren persistierten, die initial

nachweisbaren IgM-AK waren nach 2 Jahren negativ.

6/18 (33,3%) Kinder hatten initial niedrige IgG-AK-Titer (< 100 U/ml). In 4 Fällen wurden die IgM-AK negativ, die IgG-AK persistierten über einen Zeitraum von > 6 Monaten. Ein Kind zeigte nach 6 Monaten persistierende IgM- und grenzwertige IgG-AK und ein Kind verlor sowohl IgG-, als auch IgM-AK.

Lyme Arthritis: 4/4 (100%) der im Verlauf untersuchten Kinder mit LA bildeten über einen Zeitraum von > 2 Jahren hochtitrige (> 100 U/ml) IgG-AK. Nur bei einem dieser Kinder waren initial IgM-AK nachweisbar, die im Verlauf negativ wurden.

Insgesamt fand bei 11/29 (37,9%) der im Verlauf untersuchten Kinder (10 NB, 1 EM) nach bis zu 24 Monaten keine Serokonversion zu IgG statt, die IgM-AK waren nach > 6 Monaten ebenfalls negativ oder auf ein grenzwertig-positives Niveau gesunken. Bei 7/29 (24%) zunächst seropositiven Patienten (IgG bzw. IgM) waren bei Kontrolluntersuchungen zwischen 3 Monaten und 2 Jahren keine IgG- und IgM-AK mehr nachweisbar. Ein Kind mit EM bildete zu keinem Zeitpunkt nachweisbare Antikörper.

Kinder mit längerdauernder Symptomatik (≥ 3 Monate) haben höhere IgG-AK-Titer, die im Verlauf persistieren. Bei kürzerem Intervall (≤ 4 Wochen) von Symptombeginn bis Diagnosestellung wurden in der Regel keine IgG-Antikörper gefunden. Unabhängig von der Dauer der Symptomatik lässt sich bei den IgM-AK immer ein Absinken beobachten.

4.2 Lymphoproliferation auf *B. burgdorferi* und Tetanustoxoid bei Kindern mit akuter Lyme-Borreliose

4.2.1 Vorversuche zur Etablierung der Lymphoproliferations-Assays

4.2.1.1 Autologes Serum versus gepooltes humanes Serum:

Um für die Lymphozytenstimulation die optimale Zusammensetzung des Nährmediums zu ermitteln, wurden $2,5 \times 10^5$ PBMC/ml von 3 Patienten mit *B. afzelii*-Lysat und TT stimuliert und in Kulturmedien unterschiedlicher Serumzusammensetzung eingebracht: 10% autologes Serum (AS), 5% (AS), 5% (AS) + 5% gepooltes Humanserum (PHS), bzw. 10% PHS. Nach 6 Tagen wurde die ^3H -Thymidin-Inkorporation gemessen. Die Säulen in Abbildung 4 entsprechen den mittleren Proliferationen, die Linien kennzeichnen die Standardabweichungen. Eine optimale T-Zell Proliferation wurde sowohl bei TT, als auch bei *B. afzelii*, unter Verwendung von 10% autologem Serum erreicht. Die durchschnittliche Proliferation mit 10% AS versus 10% PHS unterschied sich signifikant für TT ($p = 0,03$) und *B. afzelii* ($p = 0,01$). Für alle weiteren Versuche wurde deshalb den Zellkulturmedium 10% autologes Patientenserum zugesetzt.

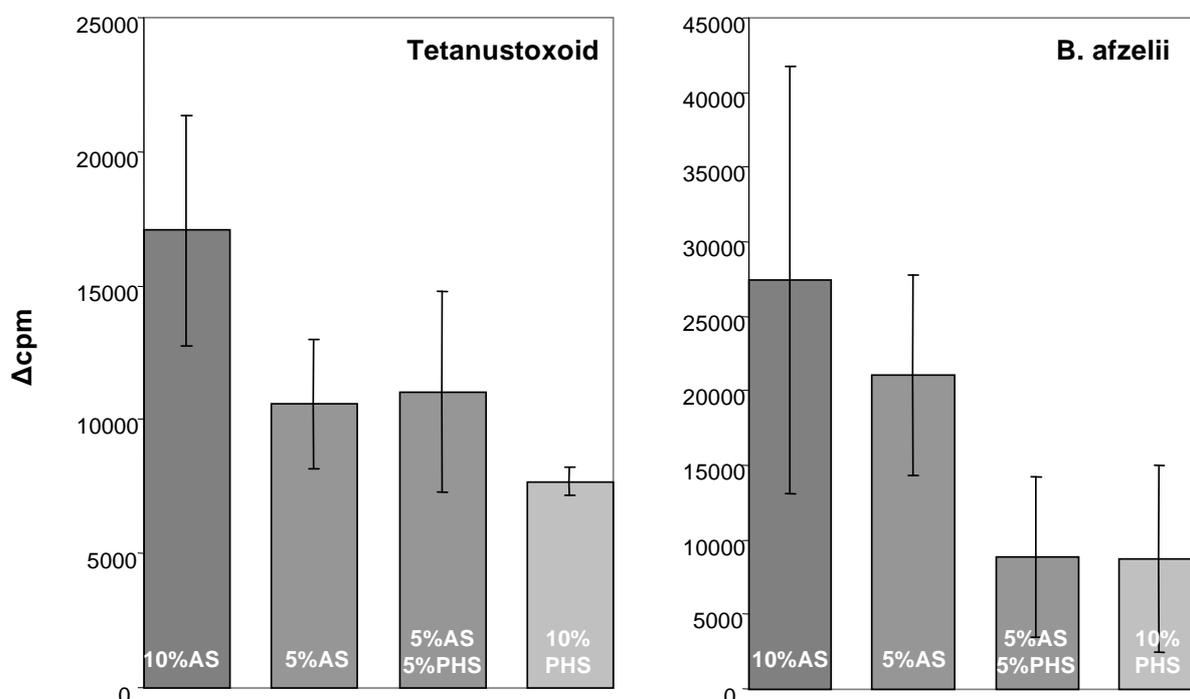


Abbildung 4: Abhängigkeit der Lymphoproliferation *B. afzelii*- und Tetanustoxoid-spezifischer T-Lymphozyten von der Zusammensetzung des Nährmediums.

4.2.1.2 Antigentitrationen

Um unter Antigenstimulation eine optimale Proliferation zu erzielen, wurden die geeigneten Konzentrationen für die jeweiligen Antigene ermittelt (Abbildung 5a): $2,5 \times 10^5$ PBMC/ml von Lyme- (schwarze Kreise) und Kontrollpatienten (weiße Kreise) wurden aufsteigenden Konzentrationen mit den Lysaten von *B. garinii* und *B. afzelii*, sowie mit TT stimuliert, nach 6 Tagen wurde der ^3H -Thymidin-Uptake gemessen.

Ebenso wurde mit den rekombinanten Proteinen OspC, Osp17, p39 und p41 verfahren (Abbildung 5b): $2,5 \times 10^5$ PBMC/ml von verschiedenen Patienten wurden mit in aufsteigenden Konzentrationen OspC, Osp17, p39 und p41 stimuliert, nach 6-tägiger Kultur wurde die ^3H -Thymidin-Inkorporation gemessen.

Eine optimale Stimulation wurde für die verschiedenen Antigene mit folgenden Konzentrationen erzielt, und demzufolge für die Stimulationsassays verwendet:

Die Lysat-Antigene pBi (*B. garinii*) und pKo (*B. afzelii*) in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$,

die rekombinanten Proteine OspC, Osp17, p17, p39 und p41 jeweils in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ und

das Kontroll-Antigen TT in einer Konzentration von 12,5 Lf/ml.

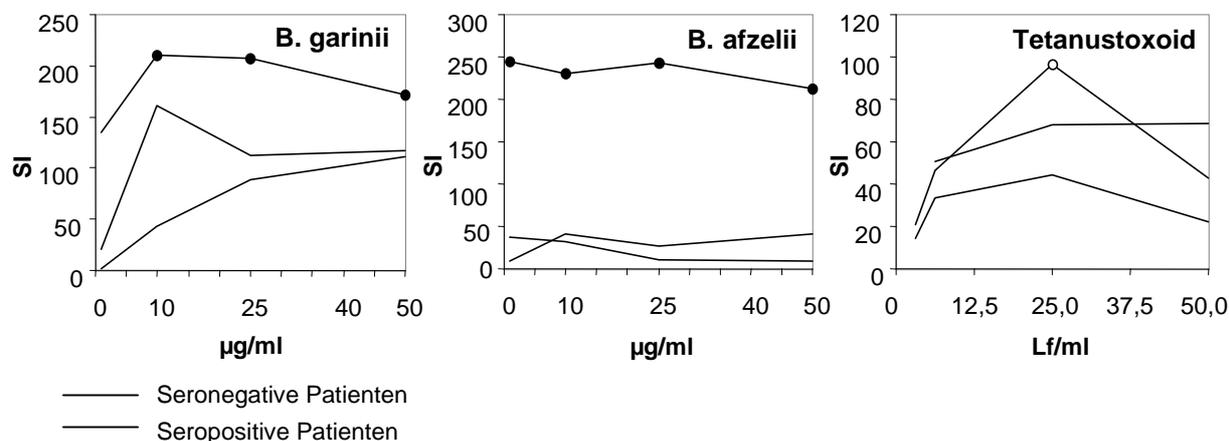


Abbildung 5a: Antigentitration (Borrelia-Lysate und Tetanustoxoid). PBMC von Lyme-Patienten (schwarze Kreise) und seronegativen Kontrollen (weiße Kreise) wurden in aufsteigenden Konzentrationen mit Borrelia-Lysaten von *B. garinii* und *B. afzelii*, sowie mit Tetanustoxoid stimuliert. Nach 6 Tagen wurde die Lymphoproliferation gemessen.

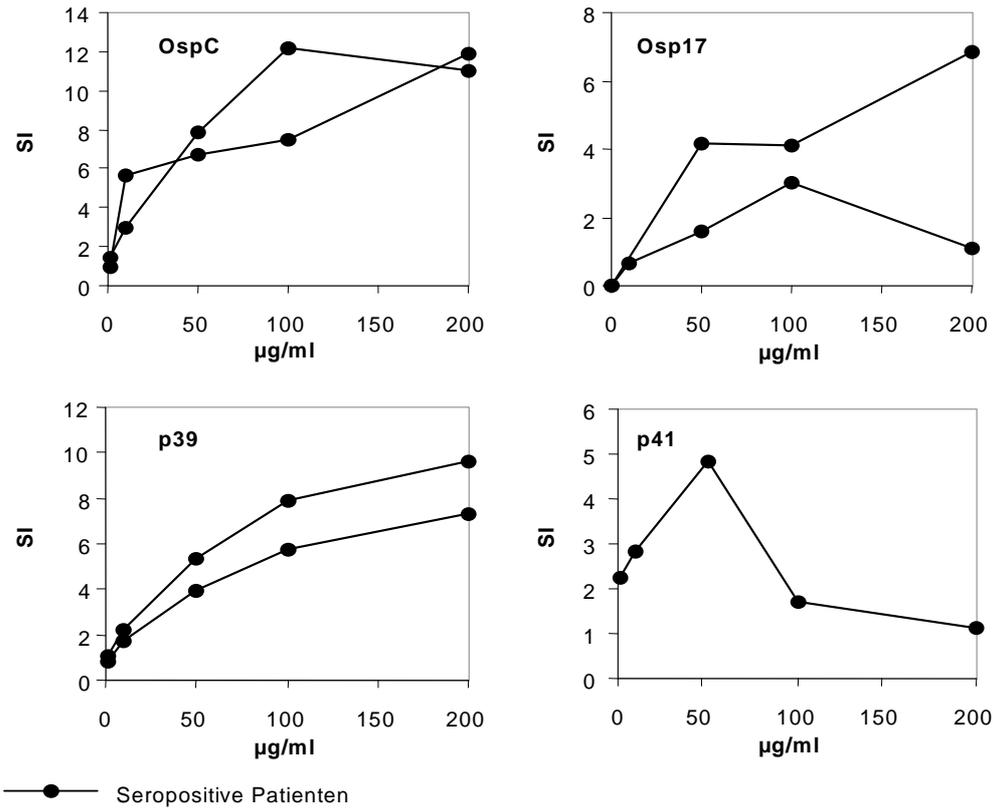


Abbildung 5b: Antigentration der rekombinanten Antigene. PBMC von Lyme-Patienten (schwarze Kreise) wurden mit den rekombinanten Borrelia-Antigenen OspC, Osp17, p39 und p41 in aufsteigender Konzentration stimuliert und nach 6 Tagen die Lymphoproliferation gemessen.

4.2.1.3 Bestimmung der Kulturdauer:

$2,5 \times 10^5$ PBMC/ml von zwei seronegativen Kontrollpatienten wurden mit *B. afzelii*-Lysat (10 µg/ml), rekombinantem OspC (50 µg/ml) und Tetanustoxoid (12,5 Lf/ml) stimuliert. Nach 4, 5, 6, 7 bzw. 8 Tagen wurde die Proliferation gemessen. Eine optimale Proliferation wurde nach einer Kulturdauer von 6 bis 7 Tagen erreicht.

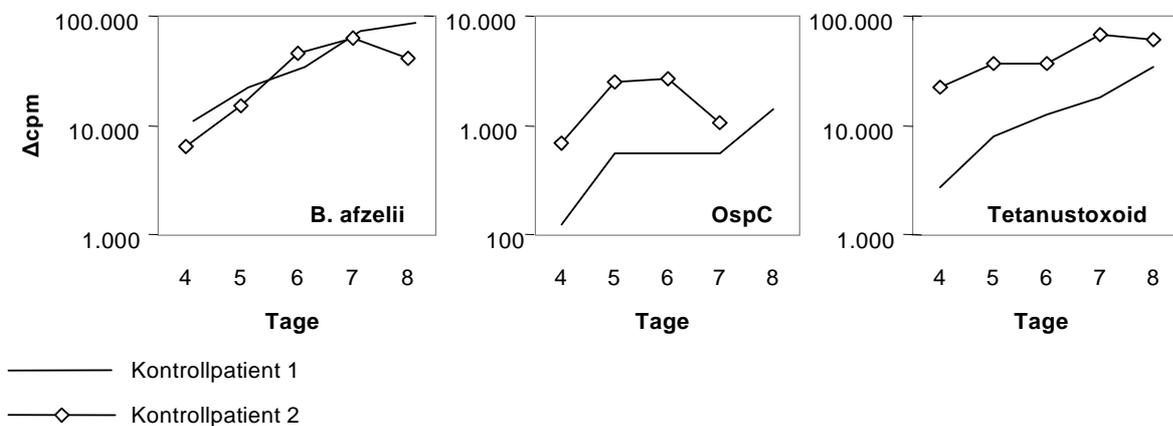


Abbildung 6: Lymphoproliferation in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer.

4.2.1.4 Altersabhängigkeit der zellulären Reaktivität auf Borrelia-Antigene und Tetanustoxoid

Um die Reaktivität der PBMC von Patienten unterschiedlicher Altersgruppen auf Borrelia-Antigene zu analysieren, wurden $2,5 \times 10^5$ PBMC/ml von 21 Patienten im Alter von 4-9 ($\bar{\Delta} 7,1$) Jahren, 15 Patienten im Alter von 10 - 14 ($\bar{\Delta} 11,2$) Jahren und 11 Kontrollen im Alter von 2 - 9 ($\bar{\Delta} 7,1$) Jahren, sowie 8 Kontrollen im Alter von 10 - 15 ($\bar{\Delta} 11,8$) Jahren wie beschrieben mit Borrelia-Lysaten (B. garinii und B. afzelii), dem rekombinanten Protein OspC und Tetanustoxoid für 6 Tage inkubiert und die Lymphoproliferation anhand der ^3H -Thymidin-Inkorporation gemessen: Die durchschnittlichen Proliferationen in den Altersgruppen der Lyme-Patienten waren vergleichbar, wohingegen zwischen den beiden Kontrollgruppen verschiedenen Alters ein deutlicher Unterschied in der durchschnittlichen zellulären Reaktivität auf Borrelia-Antigene zu beobachten war:

Tabelle 6: Vergleich der durchschnittlichen Lymphoproliferation von Kindern mit Lyme-Borreliose und Kontrollen unterschiedlicher Altersgruppen.

	(n)	Alter (Jahre)	Mittelwerte (Δcpm)			
			B. garinii	B. afzelii	OspC	TT
Patienten	21	<10	14.567	17.123	3.427	14.337
	15	≥ 10	19.920	19.097	3.429	23.042
Kontrollen	11	<10	4.872	9.490	892	14.450
	8	≥ 10	8.307	15.055	3.636	19.693

Weiterhin unterschieden sich die gemessenen Proliferationen von Kindern und Kontrollen bis zum 10. Lebensjahr auf die Lysat-Antigene pBi (Stamm B. garinii) und pKo (Stamm B. afzelii), sowie auf OspC signifikant: $p = 0,001$ für B. garinii, $p = 0,046$ für B. afzelii und $p < 0,001$ für OspC.

Dagegen unterschieden sich die Proliferationen von Kontrollpatienten ab dem 10. Lebensjahr nicht mehr für alle Antigene von denen der Lyme Patienten: $p = 0,22$ für B. garinii, $p = 0,83$ für B. afzelii, $p = 0,024$ für OspC.

Verglich man Lyme Patienten ab dem 10. Lebensjahr mit Kontrollen der selben Altersgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den durchschnittlichen Proliferationen ($p = 0,22$ für B. garinii, $p = 0,71$ für B. afzelii und $p = 0,08$ für OspC). Hinsichtlich der Reaktivität auf das Kontroll-Antigen TT konnten keine Unterschiede

beobachtet werden ($p = 0,98$ für die Altersgruppe der <10-jährigen Patienten und $p=0,65$ für die Gesamtheit der Patienten versus Kontrollen).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die Auswertung der Proliferationsdaten nur diejenigen von Lyme-Patienten und Kontrollen im Alter zwischen 2 und maximal 11 Jahren verwendet, bzw. wurden die Analysen immer im Vergleich mit einer altersentsprechenden Kontrollgruppe durchgeführt.

4.2.2 Phänotypische Analyse von PBMC vor und nach Stimulation mit B. burgdorferi und Tetanustoxoid

PBMC von Kindern mit Lyme-Borreliose und Kontrollen wurden in 6-tägiger Kulturdauer mit verschiedenen Borrelia-Antigenen und Tetanustoxoid stimuliert. Die Zusammensetzung der Ausgangspopulation der PBMC und der, durch die verwendeten Antigene stimulierbaren, proliferierenden Zellen wurde exemplarisch bei den PBMC von zwei Lyme-Patienten (JHA mit NB, CAS mit BL) und zwei seronegativen Kontrollen (AM gesund, CS mit reaktiver Arthritis) mittels fluoreszenzmarkierter Oberflächenantikörper in der Durchflußzytometrie analysiert (Tabelle 7).

Die Ausgangspopulation für die Lymphozytenstimulation (Tag 0) bestand aus durchschnittlich 13% B-Lymphozyten, 52% CD4+ T-Lymphozyten und 21% CD8+ T-Lymphozyten. Nach 6-tägiger Kultur ließ sich unter Antigenstimulation bei den Lyme-Patienten im Gegensatz zu den Kontrollen eine selektive Zunahme der CD4+ T-Lymphozyten beobachten.

Insgesamt lag auch nach Stimulation eine Mischpopulation bestehend aus 10-20% B-Lymphozyten, 45-65% CD4+ T-Lymphozyten und 13-28% CD8+ T-Lymphozyten vor. Eine selektive Expression von (HLA-DR+) MHC-Klasse-II-Molekülen, zeigten beide Lyme-Patienten, nicht jedoch die Kontrollpatienten, auf Stimulation mit Borrelia-Antigenen: Patientin CAS reagierte sowohl auf B. afzelii, als auch auf OspC, Patientin JHA reagierte nur auf OspC mit einer Aktivierung. Auf Stimulation mit TT konnte bei allen Kindern, stärker jedoch bei den beiden Lyme-Patienten, eine Aktivierung und Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen beobachtet werden (Tabelle 8).

Tabelle 7: Phänotypisierung der PBMC vor und nach Antigenstimulation.

Patient (Diagnose)	Oberflächen marker	Tag 0	% positive Zellen							
			(nach Stimulation) Tag 6							
			ohne AG	B. afzelii	Δ	OspC	Δ	TT	Δ	
JHA (NB)	+	CD19	16	12	12	0	11	-	2	-
		CD3	75	84	82	-	80	-	55	-
		CD4/CD3	52	58	66	8	56	-	38	-
		CD8/CD3	23	24	18	-	18	-	15	-
CAS (BL)	+	CD19	15	13	13	0	12	-	15	2
		CD3	68	56	80	24	79	23	69	13
		CD4/CD3	48	39	57	18	51	12	63	14
		CD8/CD3	20	15	27	12	23	8	12	-
AM (gesund)	-	CD19	18	11	20	11	14	3	9	-
		CD3	66	84	77	-	80	-	78	-
		CD4/CD3	46	61	54	-	54	-	55	-
		CD8/CD3	21	26	23	-	26	0	23	-
CS (reaktive Arthritis)	-	CD19	2	3	3	0	3	0	1	-
		CD3	77	92	89	-	91	-	90	-
		CD4/CD3	60	66	61	-	61	-	62	-
		CD8/CD3	21	27	29	2	30	3	28	1

5x10⁴ PBMC/ml von zwei seropositiven Lyme- und zwei seronegativen Kontrollpatienten wurden am Tag 0 und nach 6-tägiger Antigenstimulation mittels FACS-Analyse auf Expression von Oberflächenmarkern untersucht. Die PBMC wurden hierfür jeweils mit B. afzelii, OspC und TT stimuliert. Δ = %positive Zellen (Antigen-stimuliert, Tag 6) - %positive Zellen (ohne Antigen, Tag 0)
+ = seropositiv, - = seronegativ

Tabelle 8: MHC-Klasse-II-Moleküle werden nach Antigenstimulation von CD3+ T-Zellen exprimiert.

Patient	Lyme Serologie		Tag 0	HLA-DR/CD3-Positive Zellen (%)						
	ELISA	OspC IB		Tag 6						
				ohne AG	B. afzelii	Δ	OspC	Δ	TT	Δ
JHA	+	+	4	3	3	0	28	25	44	41
CAS	+	-	2	12	26	14	10	-	56	44
AM	-	-	2	2	3	1	4	2	8	6
CS	-	-	2	2	2	0	2	0	27	25

5x10⁴ PBMC/ml von je zwei Patienten und Kontrollen wurden mit B. afzelii, OspC und TT inkubiert und vor, bzw. nach 6-tägiger Stimulation auf die Expression von CD3- und HLA-DR-Molekülen untersucht. IB = Immunoblot. + = positiv, - = negativ

4.2.3 Zelluläre und humorale Immunreaktion auf B. Burgdorferi und rekombinante Borrelien-Proteine

Die zelluläre Immunreaktion von Kindern mit Lyme-Borreliose, gemessen an der Lymphoproliferation auf B. garinii und B. afzelii, sowie auf verschiedene rekombinante Borrelien-Proteine, wurde mit der humoralen Immunantwort, sowie mit seronegativen Kontrollen derselben Altersgruppe verglichen.

4.2.3.1 Lymphoproliferation auf B. burgdorferi-Lysate

Die Untersuchung der zellulären Reaktivität von Patienten mit unterschiedlichen Manifestationen der akuten Lyme-Borreliose (EM, BL, NB und LA) auf die Borrelien-Lysate B. garinii und B. afzelii zeigte im Vergleich zu einer jeweils altersentsprechenden Kontrollgruppe signifikante Unterschiede (Tabelle 9):

$2,5 \times 10^5$ PBMC/ml von Patienten und Kontrollen wurden mit $10 \mu\text{g/ml}$ Bakterienlysat für 6 Tage inkubiert, die Lymphoproliferation mittels ^3H -Thymidin-Inkorporation gemessen.

Es zeigte sich eine etwa 2- bis 4-fach höhere durchschnittliche Proliferation Patienten im Vergleich zu den Kontrollen. Signifikant höhere Lymphoproliferationen auf beide Lysat-Antigene ließen sich für die Gruppe der Patienten mit Neuroborreliose ($\bar{\Delta}\text{cpm} = 17.136 \pm 12.492$, $p < 0,001$ für B. garinii und $\bar{\Delta}\text{cpm} = 15.199 \pm 9.790$, $p = 0,018$ für B. afzelii), sowie für die Gesamtheit aller an Lyme-Borreliose erkrankter Kinder ($\bar{\Delta}\text{cpm} = 17.609 \pm 13.917$, $p < 0,001$ für B. garinii und $\bar{\Delta}\text{cpm} = 18.884 \pm 12.974$, $p = 0,001$ für B. afzelii) ermitteln. Die Gruppen der Patienten mit EM, IIK bzw. LA zeigten zwar ebenfalls deutlich höhere durchschnittliche Proliferationen, es ließen sich jedoch - bis auf die Lymphoproliferation auf B. garinii bei Kindern mit LA ($\bar{\Delta}\text{cpm} = 27.28 \pm 14.725$; $p = 0,046$) - keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen ermitteln: Die Fallzahlen waren in diesen Gruppen deutlich geringer.

Im direkten Vergleich der Lymphoproliferation von Kindern mit Lyme-Borreliose und gleichaltrigen seronegativen Kontrollen läßt sich erkennen, daß die lymphozytäre Reaktivität der PBMC von Kindern mit Lyme-Borreliose auf die Borrelien-Lysate insgesamt höher war, jedoch einzelne der seronegativen Kontrollen auch deutlich auf B. garinii oder B. afzelii reagierten, sowie die PBMC einzelner Lyme Patienten nur eine geringe zelluläre Reaktion auf die Antigene aufwiesen (Abbildung 7).

31/49 Proben der Lyme Patienten zeigten auf B. garinii und 35/50 Proben auf B. afzelii eine Proliferationsrate $> 10.000 \Delta\text{cpm}$. 2/4 Kinder mit Erythem migrans, 4/12 Kinder mit kutanen Manifestationen des Stadium II (BL bzw. mEM), 15/29 Kinder mit Neuroborreliose und 3/4 Kinder mit akuter Lyme-Arthritis, also insgesamt 24/48 Patienten (50%) reagierten auf beide Antigene gleichzeitig mit einer Proliferation $> 10.000 \Delta\text{cpm}$. Die Proliferation der Kontrollpatienten lag in keinem Fall für beide Antigene gleichzeitig höher als $10.000 \Delta\text{cpm}$.

Tabelle 9: Durchschnittliche Lymphoproliferation auf Lysat-Antigene.

Diagnose	Blutproben/Patienten (n/n)			ØLymphoproliferation ± Stabw (Δcpm)		p
	Antigen	Lyme	Kontrollen	Lyme	Kontrollen	
EM ¹	B. garinii	4/4	9/9	15.428 ± 12.311	6.141 ± 6.017	0,287
	B. afzelii	4/4	9/9	29.159 ± 15.178	6.818 ± 8.586	0,078
IIK ²	B. garinii	12/8	12/12	15.418 ± 15.497	5.490 ± 5.504	0,065
	B. afzelii	12/8	12/12	16.316 ± 10.792	9.283 ± 8.671	0,107
NB ³	B. garinii	29/19	14/14	17.136 ± 12.492	5.506 ± 5.115	< 0,001
	B. afzelii	29/19	15/15	15.199 ± 9.790	7.964 ± 8.257	0,018
LA ⁴	B. garinii	5/5	10/10	27.258 ± 14.725	6.459 ± 5.566	0,046
	B. afzelii	6/5	11/11	26.032 ± 19.472	6.295 ± 7.883	0,073
Lyme gesamt ⁵	B. garinii	49/35	15/15	17.609 ± 13.917	5.732 ± 5.013	<0,001
	B. afzelii	50/35	16/16	17.884 ± 12.974	7.618 ± 8.106	0,001

Stimulation der PBMC mit B. garinii- bzw. B. afzelii-Lysat. ¹ EM: Alter 8 - 10 (Ø9,5) Jahre. ² IIK: kutane Manifestationen Stadium II (BL, mEM), Alter 4 - 10 (Ø6,6) Jahre. ³ NB: Alter 4 - 13 (Ø9,3) Jahre. ⁴ LA: Alter 9 - 14 (Ø10,8) Jahre. ⁵ Lyme gesamt: Alter 4 - 14 (Ø8,9) Jahre. ¹ - ⁵ Kontrollen jeweils der selben Altersgruppe.

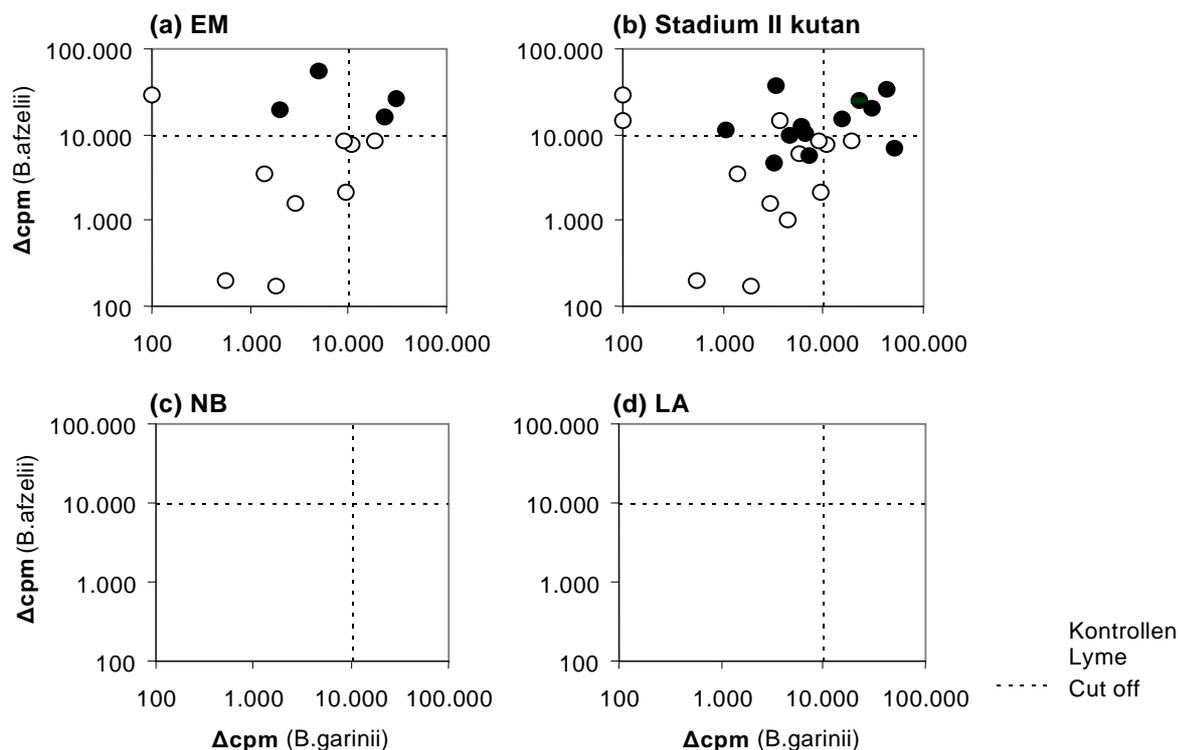


Abbildung 7 (a - d): Lymphoproliferation auf die Lysat-Antigene B. garinii und B. afzelii.

Bemerkenswert ist, daß eine gute Reaktivität auf die Borrelien-Lysate sich unabhängig von der humoralen Immunität zu bilden scheint: Insgesamt wiesen 6/24 Kinder, die gleichzeitig auf *B. afzelii* und auf *B. garinii* mit einer Lymphoproliferation > 10.000

Δ cpm reagierten, weder IgG- noch IgM-Serumantikörper (ELISA) auf. Bei 2/24 Patienten konnten keine IgG- und nur grenzwertig positive IgM-Antikörper detektiert werden. In der Gruppe der seronegativen Kontrollen reagierten 2/15 Kinder auf *B. garinii* und 4/16 Kinder auf *B. afzelii* mit einer Proliferation $> 10.000 \Delta$ cpm. Die durchschnittliche Proliferation der Kontrollen lag deutlich darunter: Δ cpm = 5.732 ± 5.013 für *B. garinii*, Δ cpm = 7.618 ± 8.106 für *B. afzelii*; Tabelle 9).

4.2.3.2 Lymphoproliferation auf rekombinantes OspC

$2,5 \times 10^5$ PBMC/ml von 37 Kindern (50 Blutproben) mit verschiedenen Manifestationen der akuten Lyme-Borreliose im Alter von 4 – 14 ($\bar{\Delta}$ 8,7) Jahren und von 15 seronegativen Kontrollen im Alter von 4 – 11 ($\bar{\Delta}$ 8,9) Jahren wurden wie beschrieben mit rekombinantem OspC in einer Konzentration von 50 μ g/ml stimuliert. Nach 6 Tagen wurde die Lymphoproliferation mittels 3 H-Thymidin-Inkorporation gemessen. Als Grenzwert für positive Ergebnisse wurde ein Wert von 2.000 Δ cpm festgelegt.

Untersucht wurden 4 Kinder mit EM und 33 Kinder mit akuter systemischer Lyme-Borreliose. Davon hatten 8 kutane Manifestationen (BL, multiple EM), 19 eine NB und 6 eine akute LA. Ein Patient, JH, der zunächst an einer NB litt und therapiert wurde, erkrankte zu einem späteren Zeitpunkt im Sinne einer Neuinfektion an einem Borrelien-Lymphozytom.

In den Patientengruppen reagierten 25/37 Kinder (67,6%) mindestens einmal deutlich positiv ($> 2.000 \Delta$ cpm; 31/50 Untersuchungen) auf rekombinantes OspC: Bei 2/4 Patienten mit EM, 5/8 Patienten des Stadium I/II, 14/19 Kindern mit NB und 4/6 Kindern mit LA konnte eine (bei Mehrfachuntersuchungen durchschnittliche) Proliferation $> 2.000 \Delta$ cpm auf Stimulation mit OspC gemessen werden. 16/25 (64%) dieser Kinder wiesen keine OspC-spezifischen AK im Serum auf. Nur 3/37 (8,1%) Patienten zeigten keine zelluläre Reaktivität auf OspC, davon hatten 2 OspC-AK, bei 8/37 Patienten (21,6%) konnte eine geringe Reaktivität auf OspC zwischen 1.000 und 2.000 Δ cpm gemessen werden (Abbildung 8).

3/15 der seronegativen Kontrollen zeigten eine Reaktivität $> 2.000 \Delta$ cpm, jedoch waren alle 3 Kinder älter als 10 Jahre und litten an einer entzündlichen bzw. infektiösen Erkrankung: 2/3 dieser Kontrollen hatten eine chronische Hepatitis B und 1 Kind hatte eine reaktive Arthritis (Abbildung 8, Tabelle 6, Altersabhängigkeit).

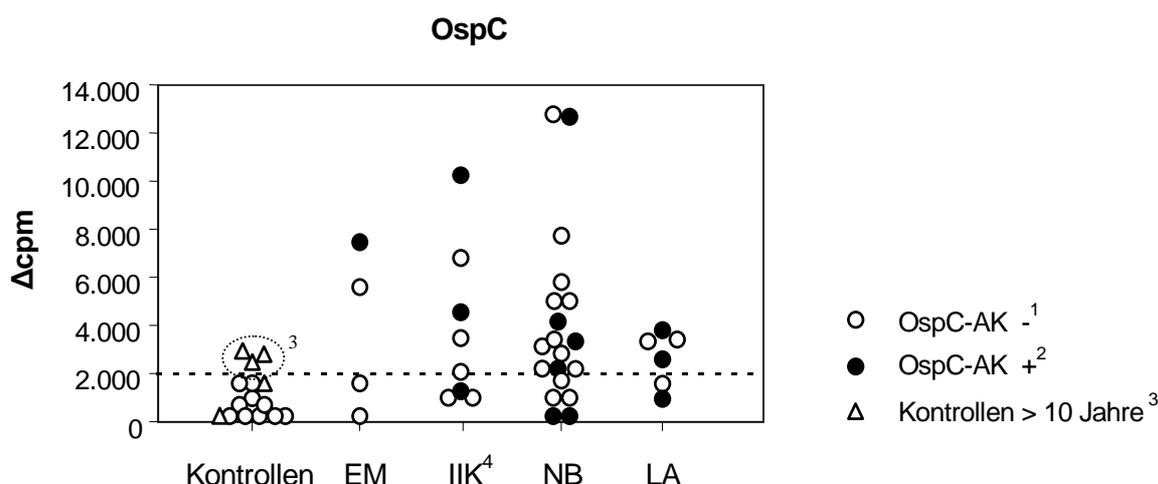


Abbildung 8: Lymphoproliferation (Δ cpm) auf rekombinantes OspC.

¹ Lyme Patienten, sowie Kontrollen < 10 Jahre. Bei 11 Patienten wurden mehrere Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht (AP, ARÖ, NS mit BL, DM mit mEM, AA, JHA, MER, MW, PLC, RK mit NB und PN mit LA): Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der einzelnen Proliferationen. ² Schwarze Kreise: Bei diesen Patienten waren im Serum OspC-spezifische IgG- und/oder IgM-AK mit Immunoblot nachweisbar. ³ Δ cpm waren nur Proliferationen von Kontrollpatienten > 10 Jahre. ⁴ IIK: Patienten mit kutanen Manifestationen einer akuten systemischen Borreliose (mEM, BL).

In Tabelle 10 sind die Mittelwerte der Proliferationen von Patienten und Kontrollen der gleichen Altersgruppe dargestellt:

Tabelle 10: Lymphoproliferation auf rekombinantes OspC.

Diagnose	Blutproben/Patienten (n/n)		$\bar{\Delta}$ Lymphoproliferation \pm Stabw (Δ cpm)		p	
	OspC-Antikörper ¹	Lyme	Kontrollen	Lyme		Kontrollen
EM	+ und -	4/4		3.711 \pm 2.936		0,156
	+	1/1	8/8	7.460	524 \pm 786	. ³
	-	3/3		2.461 \pm 1.997		.
IIK ²	+ und -	12/8		3.741 \pm 3.318		0,014
	+	4/3	11/11	4.917 \pm 4.000	802 \pm 837	0,172
	-	8/6		3.153 \pm 2.735		0,059
NB	+ und -	28/19		3.373 \pm 3.269		0,003
	+	10/7	14/14	3.161 \pm 3.525	1.168 \pm 1.048	0,130
	-	18/14		3.491 \pm 3.111		0,009
LA	+ und -	7/6		2.676 \pm 954		0,015
	+	3/3	10/10	3.172 \pm 411	1.166 \pm 1.150	.
	-	4/3		2.917 \pm 788		0,020
Lyme gesamt	+ und -	50/37		3.388 \pm 3.091		<0,001
	+	17/13	15/15	3.664 \pm 3.597	1.168 \pm 1.048	0,016
	-	33/27		3.246 \pm 2.784		0,001

¹ OspC-spezifische IgM- bzw. IgG-Antikörper im Immunoblot zum Zeitpunkt der Stimulation. ² IIK: Kinder mit kutanen Manifestationen einer akuten systemischen Lyme-Borreliose (BL, mEM). ³ bei zu geringer Anzahl von Messungen (n < 4) wurde keine statistische Analyse durchgeführt.

Die durchschnittlichen Proliferationen auf Stimulation mit rekombinantem OspC von Kindern mit Lyme-Borreliose erreichten 1,5 - 7,1fach (durchschnittlich 3,8fach) höhere Werte als diejenigen von Kontrollen der gleichen Altersgruppe. Signifikant höhere Proliferationsraten ergaben sich sowohl im Vergleich aller Patienten unabhängig vom Antikörperstatus mit der Kontrollgruppe als auch für die einzelnen Patientengruppen der systemischen Borreliose Stadium II im Vergleich zur altersentsprechenden Kontrollgruppe: $p = 0,014$ für Patienten mit kutanen Manifestationen (BL, mEM), $p = 0,003$ für Patienten mit NB und $p = 0,015$ für Patienten mit LA. OspC-AK negative Patienten mit NB oder LA wiesen ebenfalls signifikant höhere Proliferationen gegen OspC auf: $p = 0,009$ für OspC-negative Patienten mit NB und $p = 0,02$ für OspC-negative Patienten mit LA. Bemerkenswert ist allerdings, daß OspC-positive Patienten mit IIK bzw. NB eine nicht signifikant höhere Lymphoproliferation aufwiesen. Dies scheint vor allem durch die große Streubreite der Proliferationen und die geringe Anzahl der Studienpatienten generell bedingt zu sein (Abbildung 8).

4.2.3.3 Lymphoproliferation auf rekombinantes Osp17

$2,5 \times 10^5$ PBMC/ml von 33 Kindern (43 Blutproben) mit verschiedenen Manifestationen der akuten Lyme-Borreliose im Alter von 4 – 14 Jahren und von 15 seronegativen Kontrollen im Alter von 4 – 11 Jahren wurden mit rekombinantem Osp17 in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ stimuliert. Nach 6 Tagen wurde die Lymphoproliferation mittels ^3H -Thymidin-Inkorporation gemessen (Abbildung 9).

Das Ausmaß der zellulären Reaktivität auf rekombinantes Osp17 war deutlich geringer, als auf OspC: Nur in 13/43 Analysen (55,9%) konnte eine relevante Lymphoproliferation ($> 500 \Delta\text{cpm}$) auf Osp17 gemessen werden. Bei 3 dieser Patienten waren Osp17-spezifische AK im Serum nachweisbar. Dagegen zeigten 6 Analysen von Kindern mit Osp17-AK keine zelluläre Immunantwort.

Insgesamt jedoch erreichten die Proliferationen von Kindern mit LB im Vergleich zu den Kontrollen auf Stimulation mit rekombinantem Osp17 durchschnittlich 9,8-fach (0 – 54-fach) höhere Werte und unterschieden sich signifikant von den Kontrollen ($p = 0,001$, Tabelle 11).

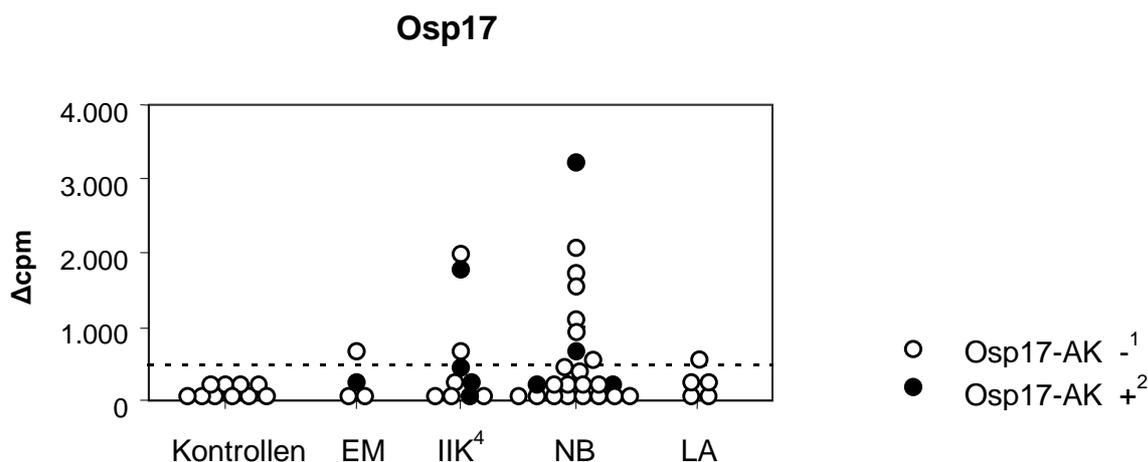


Abbildung 9: Lymphoproliferation (Δcpm) auf rekombinantes Osp17.

¹ Lyme Patienten, die keine Osp17-spezifischen Serumentikörper (Immunoblot-Analyse) aufwiesen, sowie seronegative Kontrollen. ² Schwarze Kreise: Bei diesen Patienten waren zum Zeitpunkt der Analyse im Serum Osp17-spezifische IgG-Antikörper mittels Immunoblot nachweisbar. ³ Obwohl die Proliferationsrate der seronegativen Kontrollen weit unterhalb lag, kann erst eine Proliferation $> 1.000 \Delta\text{cpm}$ als deutlich positive Reaktion gewertet werden. ⁴ IIK: Patienten mit kutanen Manifestationen einer akuten systemischen Borreliose (mEM, BL).

Tabelle 11: Lymphoproliferation auf rekombinantes Osp17

Diagnose	Blutproben/Patienten (n/n)		Ø Lymphoproliferation \pm Stabw (Δcpm)		p
	Osp17-Antikörper ¹	Lyme	Kontrollen	Lyme	
EM		4/4		285 \pm 174	0,441
	+	1/1	8/8	29	. ³
	-	3/3		315 \pm 223	.
IIK ²		10/7		736 \pm 410	0,161
	+	4/3	11/11	750 \pm 472	0,387
	-	6/5		723 \pm 369	0,350
NB		24/17		822 \pm 538	0,007
	+	4/3	12/12	1.317 \pm 987	0,300
	-	20/14		644 \pm 448	0,012
LA		5/5		204 \pm 170	0,199
	+	.	8/8	.	13 \pm 21
	-	5/5		204 \pm 170	0,199
Lyme gesamt		43/33		732 \pm 432	0,001
	+	9/7	13/13	1.062 \pm 652	0,137
	-	34/27		602 \pm 373	0,003

¹ Osp17-spezifische IgM- und/oder IgG-Antikörper im Immunoblot zum Zeitpunkt der Stimulation,

² IIK: Kinder mit kutanen Manifestationen einer akuten systemischen Lyme-Borreliose (BL, mEM).

³ bei zu geringer Anzahl von Messungen wurde keine statistische Analyse durchgeführt.

4.2.3.4 Lymphoproliferation auf das rekombinante Borrelia-Protein p39

$2,5 \times 10^5$ PBMC/ml von 23 Kindern (32 Blutproben) mit Lyme-Borreliose und von 11 Kontrollen wurden mit dem rekombinanten Borrelia-Protein p39 stimuliert.

Bei 6/23 Patienten konnte eine relevante ($> 1.000 \Delta\text{cpm}$) Proliferation gemessen werden: 2 Patienten hatten kutane Manifestationen (NS mit BL und DM mit mEM), 3 Kinder litten an einer Neuroborreliose: MW, JHA mit aseptischer Meningitis und SW mit aseptischer Meningitis und Fazialisparese, und 1 Patientin (EFÄ) hatte eine akute Lyme-Arthritis. Nur bei 2 dieser Kinder waren im Serum p39-spezifische Antikörper (Immunoblot) nachweisbar (NS und EFÄ).

Insgesamt fiel die Lymphoproliferation auf rekombinantes p39 deutlich geringer aus, als auf OspC: Die mittlere Proliferationsrate aller Patienten belief sich auf 553 ± 843 (Standardabweichung) Δcpm und unterschied sich nicht signifikant von derjenigen der Kontrollen ($302 \pm 333 \Delta\text{cpm}$, $p=0,151$).

Die p39-positiven Patienten zeigten zwar eine höhere durchschnittliche Proliferation ($1.318 \pm 1.412 \Delta\text{cpm}$), als die p39-negativen Patienten ($376 \pm 498 \Delta\text{cpm}$), unterschieden sich aber nicht signifikant ($p = 0,198$). Die Proliferationen von Patienten und Kontrollen sind in Abbildung 10 dargestellt.

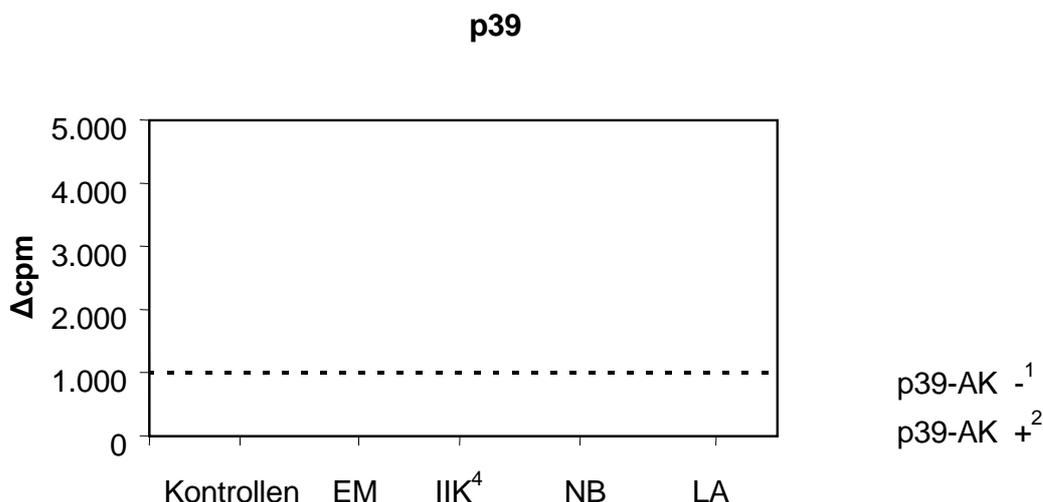


Abbildung 10: Lymphoproliferation auf das rekombinante Borrelia-Protein p39.

¹ Lyme Patienten, die keine p39-spezifischen Serumantikörper (Immunoblot-Analyse) aufwiesen, sowie seronegative Kontrollen. ² Schwarze Markierungen stellen die p39-positiven (Immunoblot) Patienten dar. ³ Obwohl die Kontrollpatienten bis auf 1 Ausnahme deutlich unter diesem Wert proliferierten, kann erst bei $\Delta\text{cpm} > 1.000$ von einer positiven Proliferationsausgangswert. ⁴ Patienten mit kutanen Manifestationen (BL, mEM) einer akuten, systemischen Lyme-Borreliose.

4.2.3.5 Lymphoproliferation auf das rekombinante Borrelia-Protein p41

$2,5 \times 10^5$ PBMC/ml von 6 Patienten (8 Blutproben, 2 Kinder wurden vor und nach, 2 Kinder nur vor und 2 Kinder nur nach antibiotischer Therapie untersucht; alle Kinder litten an einer systemischen Lyme-Borreliose) und von 2 Kontrollen wurden wie beschrieben mit 50 μ g/ml rekombinantes p41 für 6 Tage inkubiert (Abbildung 11, Proliferationen). 2/6 Patienten wiesen keine p41-spezifischen Antikörper im Serum auf (AP, PW). 4/6 Kinder zeigten eine deutlich positive lymphozytäre Reaktion auf p41 mit einer durchschnittlichen Proliferation von 5.546 ± 833 (Standardabweichung) Δ cpm. Diese 4 Kinder und ein weiteres Kind, das keine Reaktivität zeigte (PLC), wurden in einem Zeitraum von vor bis 4 Monate nach Erkrankungsbeginn untersucht.

Das Ausmaß der zellulären Reaktivität schien von der Antikörperbildung auf p41 unabhängig zu sein. Insgesamt wurde bei den Patienten eine mittlere Proliferation von 2.979 ± 2637 Δ cpm gemessen. Die beiden Kontrollen proliferierten mit 417 ± 417 Δ cpm deutlich niedriger. Auf eine statistische Analyse wurde aufgrund der geringen Fallzahl verzichtet.

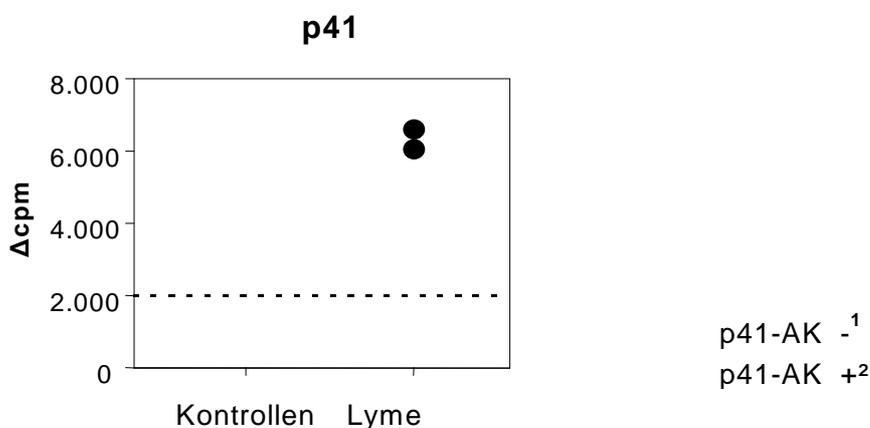


Abbildung 11: Lymphoproliferation auf das rekombinante Borrelia-Protein p41.

¹ Lyme Patienten, die keine p41-spezifischen Serumantikörper (Immunoblot-Analyse) aufwiesen, sowie seronegative Kontrollen. ² Schwarze Markierungen: Bei diesen Patienten waren p41-spezifische IgM- und/oder IgG-Antikörper im Serum mittels Immunoblot nachweisbar. ³ Der Grenzwert zwischen positiven und negativen Ergebnissen wurde hier analog zu OspC gewählt.

4.2.3.6 Lymphoproliferation auf Tetanustoxoid

Als Kontroll-Antigen diente das Recall-Antigen Tetanustoxoid. 50 Blutproben von 35 Kindern mit Lyme-Borreliose und 16 Blutproben von ebenso vielen Kontrollen wurden hinsichtlich ihrer Reaktivität auf Tetanustoxoid wie beschrieben untersucht. Alle Patienten waren gegen Tetanus geimpft. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Proliferation von Patienten mit Lyme-Borreliose ($18.088 \pm 12.577 \Delta\text{cpm}$) und Kontrollen ($15.645 \pm 10.388 \Delta\text{cpm}$) festgestellt werden, $p=0,455$.

Die Proliferationen der einzelnen Patientengruppen und der Kontrollen der selben Altersgruppe sind in Tabelle 12 dargestellt:

Tabelle 12: Lymphoproliferation auf Tetanustoxoid.

Diagnose	Blutproben/Patienten (n/n)		Ø Lymphoproliferation ± Stabw (Δcpm)		p
	Lyme	Kontrolle	Lyme	Kontrollen	
EM	4/4	9/9	30.229 ± 11.503	18.082 ± 10.047	0,170
IJK	12/8	11/11	19.102 ± 10.632	14.110 ± 11.103	0,293
NB	28/19	14/14	15.882 ± 13.076	14.695 ± 10.516	0,760
LA	6/5	10/10	18.263 ± 9.107	18.041 ± 9.738	0,967
Lyme gesamt	50/35	16/16	18.088 ± 12.577	15.645 ± 10.388	0,455

4.2.4 Einfluß der Therapie auf das Proliferationsverhalten

Von 10 Patienten konnten Lymphoproliferations Assays vor und nach der Antibiotika-Therapie durchgeführt werden. 6/10 Kinder waren an einer NB erkrankt, 3/10 Kinder hatten ein BL und ein Kind eine Lyme-Arthritis. Die PBMC wurden bei Diagnosestellung und 1 bis 6 (durchschnittlich 3) Monate danach untersucht (Abbildungen 12 a-c). Hierbei war zwischen den Proliferationen der Patienten mit unterschiedlichen klinischen Manifestation der LB kein Unterschied fest zu stellen.

Die Proliferationen vor antibiotischer Therapie unterschieden sich nicht signifikant von den Proliferationen nach Therapie für alle untersuchten Borrelia-Antigene: $p = 0,98$ für *B. garinii*, $p = 0,69$ für *B. afzelii*, $p = 0,41$ für OspC, $p = 0,40$ für Osp17, $p = 0,28$ für p39. Ebenso wenig beeinflusst blieb erwartungsgemäß die Reaktivität auf das Kontroll-Antigen Tetanustoxoid ($p = 0,81$).

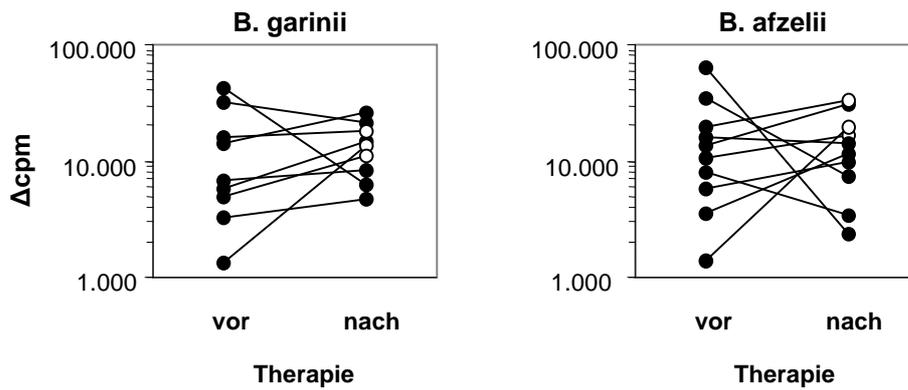


Abbildung 12a: Lymphoproliferation auf Lysat-Antigene vor und nach antibiotischer Therapie. Weiße Kreise: Zum Zeitpunkt der Analyse waren im Serum der Patienten keine Borrelien-spezifischen IgG- bzw. IgM-Antikörper (ELISA) nachweisbar.

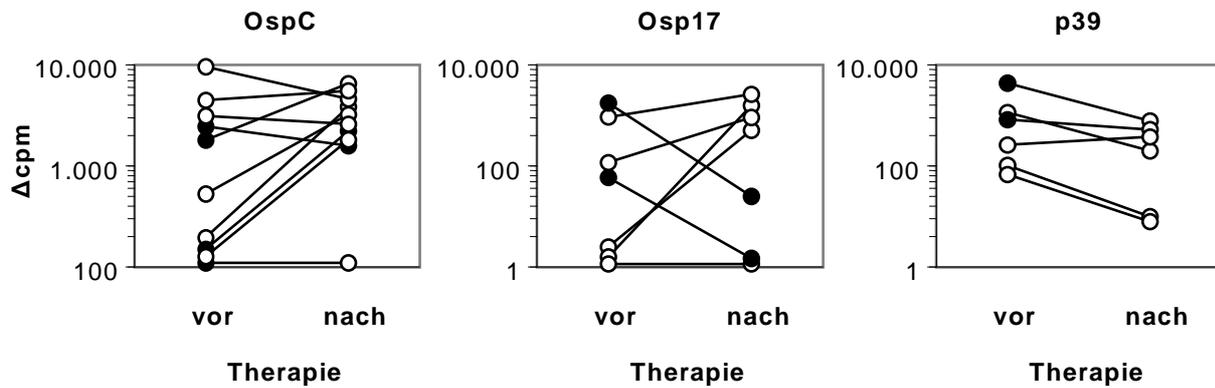


Abbildung 12b: Lymphoproliferation auf die rekombinanten Antigene OspC, Osp17 und p39 vor und nach antibiotischer Therapie. Weiße Kreise: Zum Zeitpunkt der Analyse waren im Serum der Patienten mittels Immunoblot keine spezifischen IgG- bzw. IgM-Antikörper auf das jeweilige Antigen nachweisbar.

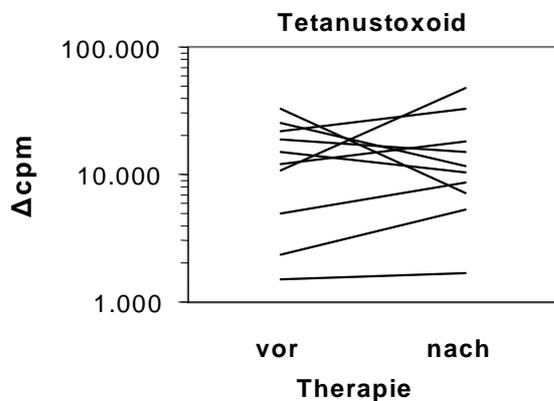


Abbildung 12c: Lymphoproliferation auf das Recall-Antigen Tetanustoxoid vor und nach antibiotischer Therapie.

Obwohl es bei 3/9 (*B. garinii*) bzw. 3/10 (*B. afzelii*) Patienten zu einem Verlust der Borrelien-spezifischen Antikörper gekommen war, blieb die zelluläre Reaktivität gegenüber Borrelien-Lysaten über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten nach Therapie insgesamt erhalten (Abbildung 12a). Ebenso konnte für die Oberflächenproteine OspC, Osp17 und p39 beobachtet werden, daß die zelluläre Reaktivität auch bei Verlust nachweisbarer spezifischer Antikörper im Serum bis zu 6 Monate nach Therapie erhalten blieb (Abbildung 12b).

4.3 Zytokinsekretion *B. burgdorferi*-spezifischer Lymphozyten

Um die T-Zell Reaktivität auf *Borrelia burgdorferi* bzw. einzelne Oberflächenproteine funktionell zu charakterisieren, wurde die Zytokinsekretion ausgewählter pro- bzw. anti-inflammatorischer Zytokine in den Zellkulturüberständen aus 23 Blutproben (BP) von 18 Lyme-Patienten mit unterschiedlichen Manifestationen einer akuten Lyme-Borreliose gemessen und ihr Zytokinmuster untersucht. 4/18 Kinder hatten ein EM (5 BP), 4/18 Kinder hatten ein BL (6 BP), 6/18 Kinder hatten eine NB (7 BP) und 4/18 Kinder hatten eine LA (5 BP). 7/18 Kinder wurden vor, 7/18 nach, 4/18 vor und nach antibiotischer Therapie) untersucht. Die PBMC der 18 Patienten und von 2 seronegativen Kontrollen wurden mit *B. garinii*-Lysat (10 µg/ml), *B. afzelii*-Lysat (10 µg/ml), sowie OspC (50 µg/ml) und TT (12,5 Lf/ml) stimuliert. Nach 5-tägiger Kultur wurden die Konzentrationen von Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-10 (IL-10) sowie Interleukin-4 (IL-4) in den Zellkulturüberständen mittels Zytokin-ELISA gemessen.

4.3.1 Interferon- γ (IFN- γ) Sekretion

Die Analyse der IFN- γ Konzentrationen brachte folgende Ergebnisse:

- Auf Stimulation mit *B. garinii* konnte in 13/17 untersuchten Zellkulturen (76,5%) eine deutliche IFN- γ Sekretion (>50pg/ml) gemessen werden. Ein Kind hatte ein EM, ein Kind mEM, 3 Kinder hatten ein BL, 6 Kinder eine NB und 2 Kinder eine LA. In den übrigen 4/17 (23,5%) Analysen - von einer Patientin mit EM (FP), 2 von einer Patientin mit BL (ARÖ) und einem Kind mit LA (DB) - wurde eine geringere IFN- γ Sekretion (<50pg/ml) gemessen.
- Auf Stimulation mit *B. afzelii* konnte in 19/23 Proben (82,6%) >50pg/ml IFN- γ detektiert werden. 5 Patienten hatten ein EM bzw. mEM, 5 Patienten hatten ein BL, 6 Patienten eine NB und 3 Patienten eine LA. 4/23 (17,4%) Kulturen enthielten nur

geringen Mengen IFN- γ : Siestammten von jeweils einem Kind mit BL (AR γ bzw. NB (HS), sowie 2 Kindern mit LA (DR und PN).

- auf Stimulation mit OspC wurden in 10/21 Kulturen (47,6%) eine IFN- γ Sekretion > 50 pg/ml gemessen: Davon hatte ein Kind ein EM, ein Kind mEM, 3 Kinder ein BL, 2 Kinder eine NB und 3 Kinder eine LA. 3/5 Patienten mit EM, 2/5 Patienten mit BL, 4/7 Patienten mit NB, sowie 2/5 Patienten mit LA, also insgesamt 11/21 (52,4%) zeigten eine deutliche IFN- γ Sekretion.
- auf Stimulation mit Tt konnten in 16/23 Kulturen (69,6%) eine IFN- γ Sekretion > 50 pg/ml gemessen werden. 7/23 Kulturen von Kindern mit unterschiedlichen Manifestationen zeigten eine deutliche IFN- γ Sekretion.

Die Ergebnisse der IFN- γ Analysen sind in Tabelle 13 zusammengefasst:

Tabelle 13 Durchschnittliche Interferon- γ Sekretion Borrelia-spezifischer Zellen.

	IFN- γ Sekretion in Zellkultur überstand											
	(ELISA)											
	B. garinii			B. afzelii			OspC			Tetanustoxoid		
	(n)	\bar{x}	Stabw	(n)	\bar{x}	Stabw	(n)	\bar{x}	Stabw	(n)	\bar{x}	Stabw
vor Therapie	(8)	540	± 456	(10)	600	± 656	(9)	50	± 57	(10)	189	± 345
nach Therapie	(9)	509	± 467	(13)	406	± 375	(12)	86	± 66	(13)	417	± 424
gesamt	(17)	525	± 461	(23)	499	± 537	(21)	71	± 65	(23)	308	± 405
Kontrollen	(2)	258	± 218	(2)	435	± 411	(2)	21	± 21	(2)	54	± 22

PBMC von insges. 18 Lyme-Patienten (23 Blutproben) und 2 seronegativen Kontrollpatienten wurden auf Sekretion von IFN- γ nach Stimulation mit Borrelia-Antigenen sowie Tt untersucht (n) = Anzahl der untersuchten Blutproben, \bar{x} = Mittelwerte, Stabw = Standardabweichung.

Wie in Abbildung 13 auf S. 65 erkennbar ist, reagierten die PBMC der Patienten sehr unterschiedlich auf Antigenstimulation: Es konnten sowohl Zellkulturen mit deutlicher Proliferation, jedoch geringer IFN- γ Sekretion, als auch solche mit niedriger Proliferation, aber vergleichsweise hoher IFN- γ Sekretion beobachtet werden.

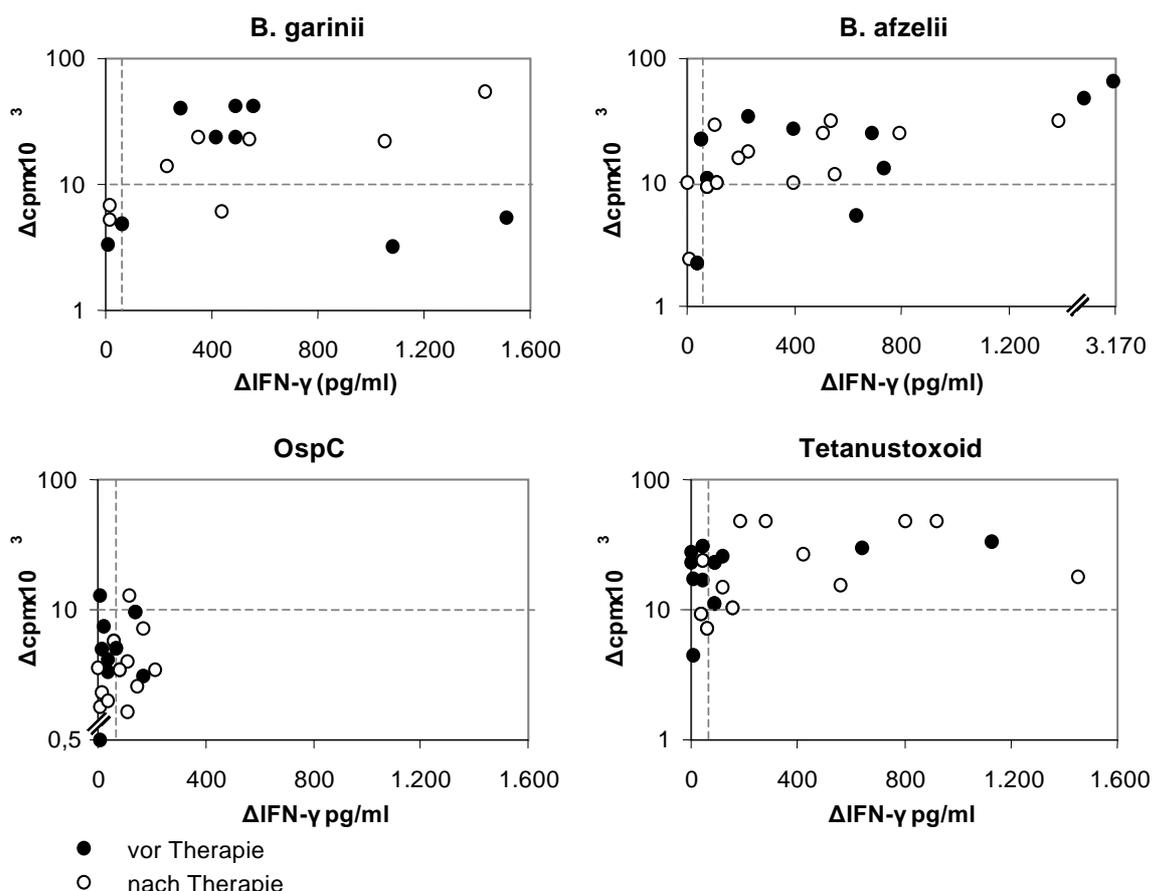


Abbildung 13: IFN- γ -Sekretion Borrelia-spezifischer Zellen.

PBMC (23 Blutproben) von 18 Patienten (7/18 vor, 7/18 nach, 4/18 vor und nach antibiotischer Therapie) wurden jeweils mit *B. garinii*- und *B. afzelii*-Lysat, sowie mit OspC und Tetanustoxoid stimuliert. Nach 5-tägiger Kultur wurde die IFN- γ Konzentration im Zellkulturüberstand (ELISA), sowie die jeweilige Proliferation gemessen.

Zusammenfassend konnte für jedes der Borrelia-Antigene, sowie für TT eine deutliche durchschnittliche IFN- γ Sekretion ermittelt werden. Die IFN- γ Sekretion auf die Lysat-Antigene sowie TT war jedoch signifikant höher als diejenige auf OspC: $p = 0,001$ für *B. garinii*, $p = 0,001$ für *B. afzelii* und $p = 0,012$ für TT. Die IFN- γ Sekretion in den Borrelia-Lysat Stimulationen unterschied sich nicht signifikant von derjenigen in den TT Stimulationen. Im Vergleich zu den seronegativen Kontrollen sezernierten die PBMC der Lyme-Patienten auf Stimulation mit Borrelia-Antigenen und TT durchschnittlich mehr IFN- γ . Eine IFN- γ Sekretion der Lyme-Patienten konnte unabhängig von der klinischen Manifestation nachgewiesen werden. Es ließ sich kein proportionaler Zusammenhang der Proliferationsaktivität und der IFN- γ Sekretion erkennen. Bei der Untersuchung der IFN- γ -Sekretion von Borrelien- bzw. TT-stimulierten PBMC zeigte sich kein Unterschied zwischen den Blutproben, die vor bzw. bis zu 24 Wochen nach antibiotischer Therapie abgenommen wurden.

4.3.2 Sekretion von IL-10

Die Analyse der IL-10 Konzentration im Zellkulturüberstand erbrachte folgende Ergebnisse, die in Tabelle 14 zusammengestellt sind:

Insgesamt konnte auf Stimulation mit *B. garinii* in 10/17 Kulturen (58,8%) eine deutliche IL-10 Sekretion (> 25 pg/ml) gemessen werden: 2/10 Kinder hatten ein EM, 3/10 Kinder ein BL, 4/10 Kinder eine NB und 1 Kind eine LA. Auf Stimulation mit *B. afzelii* konnte in 9/23 Kulturen (39,1%) > 25 pg/ml IL-10 detektiert werden. 3/9 Patienten hatten ein EM, 2/9 ein BL, 3/9 Kinder eine NB und ein Patient eine LA. Auf Stimulation mit OspC konnte in 7/22 Zellkulturen (31,8%) eine IL-10 Sekretion > 25 pg/ml detektiert werden. Davon hatten 2 Patienten ein EM, 2 Patienten ein BL und 3 Patienten eine NB. Keiner der Patienten mit LA reagierten mit einer deutlichen IL-10 Sekretion. Im Gegensatz dazu konnte auf Stimulation mit TT nur bei 1/23 Kulturen eine IL-10 Sekretion > 25 pg/ml gemessen werden (Patient PN mit LA, 43 pg/ml).

Im Vergleich zu den Kontrollen sezernierten die Lyme-Patienten durchschnittlich mindestens 10-fach mehr IL-10 auf Stimulation mit *B. burgdorferi*-Lysaten sowie auf Stimulation mit OspC. Die durchschnittliche IL-10 Konzentration in den Stimulationen mit OspC war vergleichbar mit den durchschnittlichen IL-10 Konzentrationen in den *Borrelia*-Lysat Stimulationen ($p = 0,291$ für *B. garinii*, $p = 0,722$ für *B. afzelii*). Im Vergleich zu den TT-Stimulationen wurden in den *Borrelia*-Lysat bzw. OspC-Stimulationen signifikant höhere IL-10 Konzentrationen ermittelt ($p = 0,026$ für *B.garinii*, $p = 0,008$ für *B. afzelii* bzw. $0,007$ für OspC). Auf Stimulation mit TT ergab sich zu den Kontrollpatienten kein Unterschied in der Ausprägung der IL-10 Sekretion.

Tabelle 14: Durchschnittliche IL-10 Sekretion *Borrelia*-spezifischer Zellen.

	IL-10 Konzentration im Zellkulturüberstand (ELISA)							
	B garinii		B. afzelii		OspC		Tetanustoxoid	
	(n)	Øpg/ml ± Stabw	(n)	Øpg/ml ± Stabw	(n)	Øpg/ml ± Stabw	(n)	Øpg/ml ± Stabw
vor Therapie	(9)	25,0 ± 20,2	(11)	32,0 ± 33,2	(10)	24,3 ± 22,0	(10)	6,2 ± 12,8
nach Therapie	(8)	91,7 ± 111,7	(12)	40,7 ± 63,3	(12)	37,4 ± 51,3	(12)	2,6 ± 5,0
Lyme gesamt	(17)	56,4 ± 84,4	(23)	36,5 ± 51,4	(22)	31,4 ± 41,2	(22)	4,3 ± 9,5
Kontrollen	(2)	0,5 ± 0,5	(2)	3,0 ± 3,0	(2)	1,0 ± 1,0	(2)	6,5 ± 6,5

PBMC von insgesamt 18 Lyme-Patienten (23 Blutproben) und 2 seronegativen Kontrollpatienten wurden auf Sekretion von IFN- γ nach Stimulation mit *Borrelia*-Antigenen sowie TT untersucht. (n) = Anzahl der untersuchten Blutproben, Ø = Mittelwerte, Stabw = Standardabweichung.

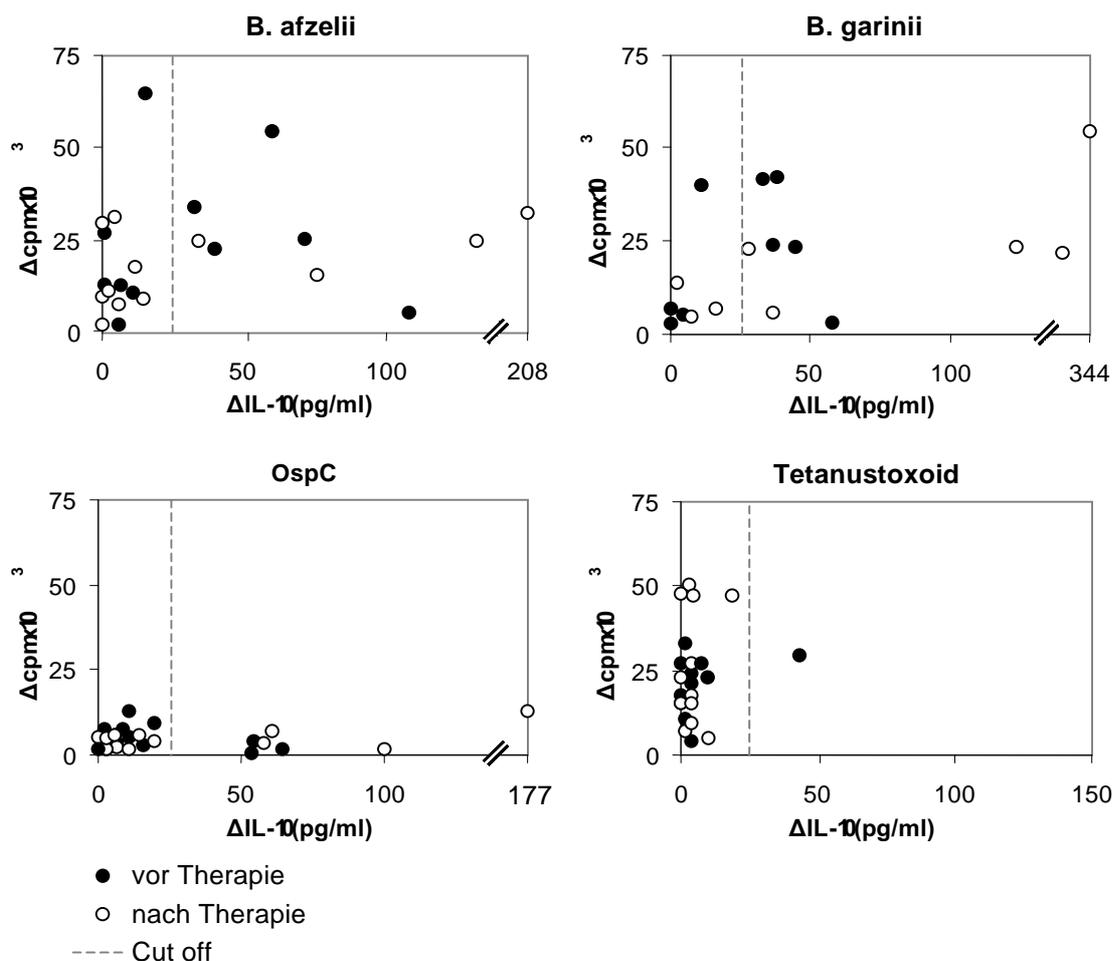


Abbildung 14: IL-10 Sekretion Borrelia-spezifischer Zellen.

PBMC (23 Blutproben) von 18 Lyme-Patienten (7/18 vor, 7/18 nach, 4/18 vor und nach antibiotischer Therapie) wurden jeweils mit *B. garinii*, *B. afzelii*, OspC sowie TT stimuliert. Nach 5-tägiger Kultur wurde die IL-10-Sekretion im Zellkulturüberstand (ELISA), sowie die Proliferation gemessen.

$\Delta IL-10 = IL-10(\text{Antigenstimulation}) - IL-10(\text{ohne Antigen})$.

Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, war die IL-10 Sekretion in den Kulturen sehr variabel: Es konnten sowohl Kulturen mit deutlicher Proliferation, jedoch geringer IL-10 Sekretion, als auch solche mit niedriger Proliferation, aber vergleichsweise hoher IL-10 Sekretion beobachtet werden. Für alle Borrelia-Antigene, nicht aber für TT konnte eine deutliche IL-10 Sekretion ($> 25 \text{ pg/ml}$) ermittelt werden: Die durchschnittliche IL-10 Konzentration der *B. burgdorferi* Kulturen lag bei $56 \pm 84 \text{ pg/ml}$ (*B. garinii*) bzw. $36 \pm 51 \text{ pg/ml}$ (*B. afzelii*), der OspC Kulturen bei $31 \pm 41 \text{ pg/ml}$ und der TT Kulturen bei $4,3 \pm 9,5 \text{ pg/ml}$. Es konnte kein signifikanter Unterschied der IL-10 Sekretion vor bzw. bis zu 24 Wochen nach Antibiotikatherapie beobachtet werden (Tabelle 14; $p = 0,161$ für *B. garinii*, $p = 0,694$ für *B. afzelii*, $p = 0,455$ für OspC und $p = 0,440$ für TT).

Das Zytokin-Sekretionsmuster nach Stimulation mit Borrelia-Antigenen bzw. mit TT ließ im Vergleich von IL-10- und IFN- γ -Sekretion keinen Zusammenhang erkennen.

4.3.3 Sekretion von IL-4

Weder auf Stimulation mit Borrelia-Antigenen, noch auf TT konnte eine relevante IL-4 Sekretion in den Zellkulturüberständen gemessen werden. Es konnten durchschnittliche IL-4 Konzentrationen von 0,1 pg/ml für *B. garinii*-, von 0,7 pg/ml für *B. afzelii*-, von 0,6 pg/ml für OspC- und von 2,3 pg/ml für TT-stimulierte Kulturen ermittelt werden. Lediglich bei einer Patientin (EFÄ mit LA) konnte eine geringe IL-4-Konzentration von 10,6 pg/ml nachgewiesen werden. Bei den Kontrollpatienten waren ebenfalls keine relevanten IL-4 Konzentrationen nachweisbar. Nur in der TT-Stimulation ließ sich bei der Kontrollpatientin LKF (mit chronischer Hepatitis B) eine leicht erhöhte IL-4 Konzentration von 11,7 pg/ml nachweisen. Wie auch bei IFN- γ und IL-10 konnte bei der IL-4-Sekretion kein Zusammenhang von Proliferationsaktivität und Zytokinsekretion beobachtet werden (Abbildung 15).

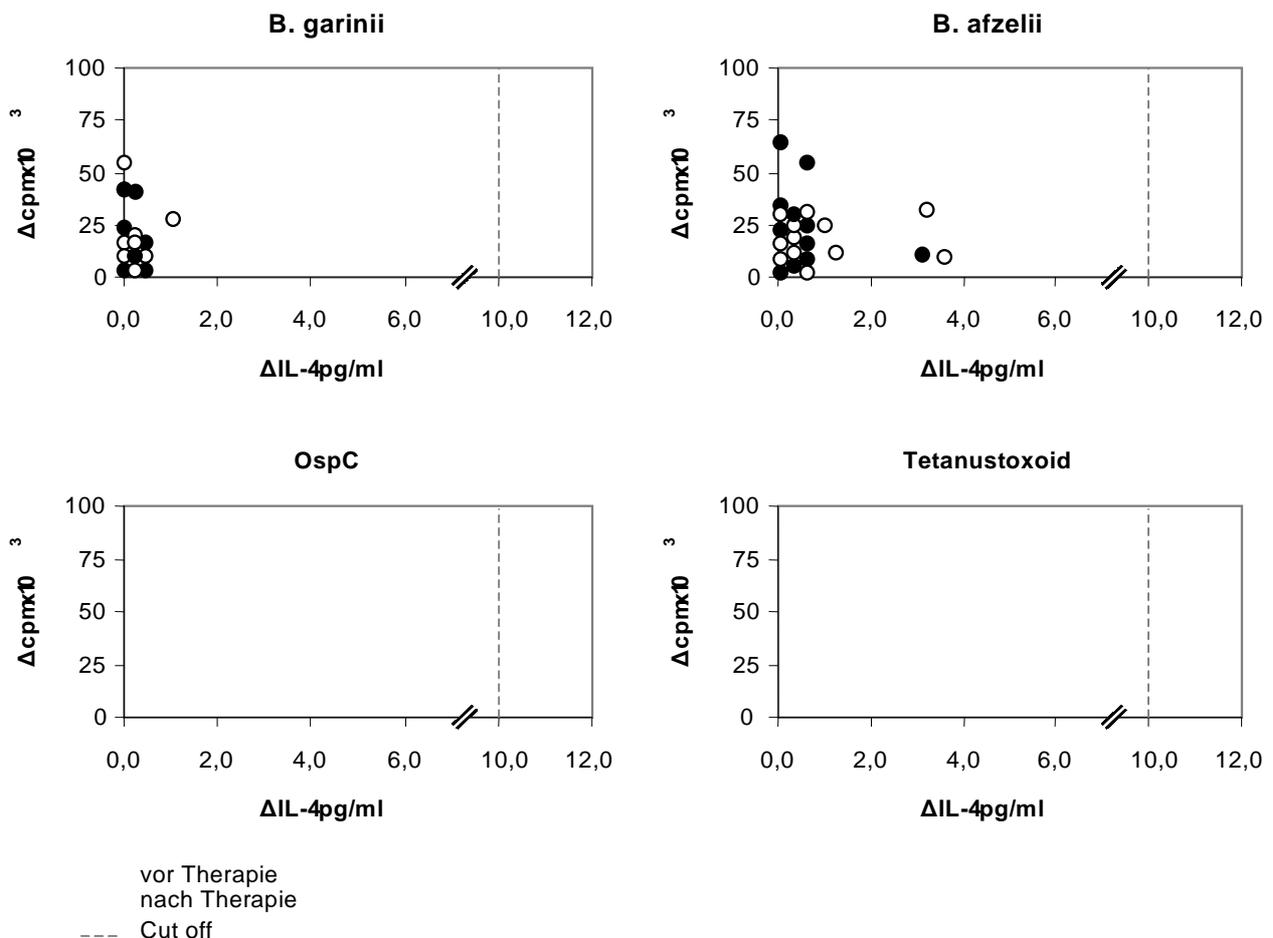


Abbildung 15: IL-4-Sekretion Borrelia-spezifischer Zellen.

PBMC von 18 Lyme-Patienten (23 Blutproben; 7/18 vor, 7/18 nach und 4/18 vor und nach antibiotischer Therapie) wurden mit Lysat-Antigen (*B. afzelii*, bzw. *B. garinii*), sowie OspC und Tetanustoxoid stimuliert. Nach 5-tägiger Kultur wurde die IL-4-Sekretion im Zellkulturüberstand gemessen (ELISA). Gleichzeitig wurde die Proliferation bestimmt. $\Delta IL-4 = IL-4(\text{Antigenstimulation}) - IL-4(\text{ohne Antigen})$.

4.3.4 Zytokin-Sekretion bei Co-Stimulation mit IL-12

IL-12 wurde als proinflammatorisches Zytokin beschrieben, das die IFN- γ Sekretion und die antigenspezifische T-Zell-Proliferation fördert (Scott 1993, Manetti et al. 1993, Germann et al. 1993, Trinchieri et al. 1995).

Um den Einfluß von IL-12 auf die antigenspezifische Zytokinproduktion von IL-10 und IFN- γ zu untersuchen, wurden 25×10^5 PBMC/ml von 7 Lyme-Patienten (3/7 vor und 4/7 nach antibiotischer Therapie) mit *B. garinii*-Lysat (10 μ g/ml), *B. afzelii*-Lysat (10 μ g/ml), sowie OspC (50 μ g/ml) und Tetanustoxoid (12,5 Lf/ml) stimuliert. Jede Kondition wurde 12-fach angelegt. Jeweils einem Drittel der Kulturen wurde 10 ng/ml IL-12 bzw. 2 μ g/ml anti-IL-12-AK zugefügt. Ein Drittel wurde ohne exogene Zytokinzufuhr inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden nach 5-tägiger Kultur abgenommen und die Konzentrationen von IFN- γ und IL-10 mittels Zytokin-ELISA gemessen. Ebenfalls wurde die Proliferation der einzelnen Kulturen gemessen. Um die gemessenen Zytokin-Konzentrationen jeweils in Relation zur Proliferation zu setzen wurde ein Sekretions-Index gebildet.

4.3.4.1 IFN- γ Sekretion bei Co-Stimulation mit IL-12

In den Kulturen mit exogen zugefügtem IL-12 lag die IFN- γ -Sekretionskonzentration signifikant höher als in den Kulturen ohne IL-12 bzw. mit anti-IL-12-AK, die Proliferationsaktivität der Zellkulturen mit bzw. ohne Zugabe von IL-12 oder anti-IL-12-AK unterschied sich jedoch nicht.

Die IFN- γ Konzentration in den Zellkulturüberständen unter Stimulationen mit *B. burgdorferi*-Lysat plus IL-12 im Durchschnitt 5967 ± 3620 pg/ml, entsprechend dem 6,5-fachen der *B. burgdorferi* Kulturen ohne IL-12 (916 ± 877 pg/ml, $p = 0,002$). Die IFN- γ Konzentration in den IL-12-stimulierten Kulturen betrug $11,9$ -fache im Vergleich zur Stimulation mit *B. burgdorferi* plus anti-IL-12-AK (503 ± 356 pg/ml, $p = 0,001$). In den Stimulationen mit OspC plus IL-12 lag die durchschnittliche IFN- γ Konzentration bei 5216 ± 4374 pg/ml, entsprechend dem 68,5-fachen der OspC Kulturen ohne IL-12 (76 ± 63 pg/ml, $p = 0,028$), bzw. dem 35,7-fachen bei Stimulation mit OspC plus anti-IL-12-AK (146 ± 256 pg/ml, $p = 0,030$). Die IFN- γ Konzentration in den Stimulationen mit Tetanustoxoid plus IL-12 betrug im Durchschnitt 4308 ± 2908 pg/ml, entsprechend dem 7,7-fachen der TT Stimulationen

ohne IL-12 ($\bar{558} \pm 511$ pg/ml, $p = 0,019$), bzw. dem 24,4-fachen der Stimulationen mit TT plus anti-IL-12-AK ($\bar{177} \pm 215$ pg/ml, $p = 0,013$).

Es konnte kein Unterschied in der Ausprägung der Zytokinsekretion vor bzw. bis zu 24 Wochen nach antibiotischer Therapie beobachtet werden (Abbildung 16).

Um das Ausmaß der Proliferationen bei der Betrachtung der IFN- γ Konzentration zu berücksichtigen wurde ein Sekretionsindex errechnet, der die IFN- γ -Sekretion in Relation zur Proliferation setzt. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der verschiedenen Antigen-Stimulationen dargestellt:

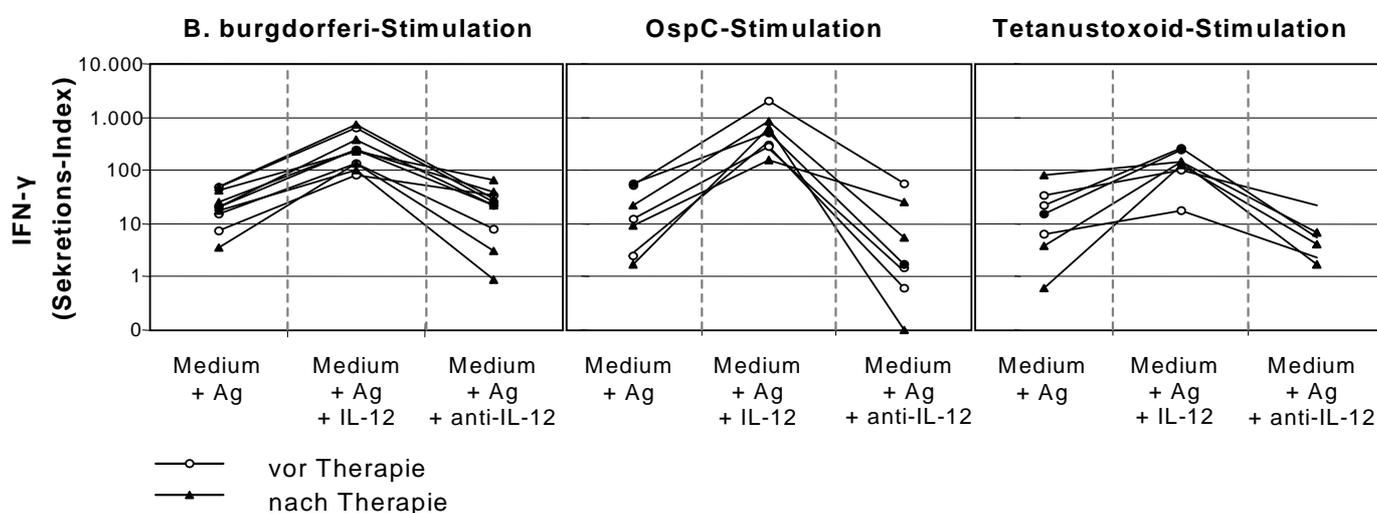


Abbildung 16: IFN- γ Produktion B. burgdorferi- und Tfspezifischer Lymphozyten in Abhängigkeit von IL-12 bzw. anti-IL-12-AK.

PBMC von 7 Patienten (3/7 vor und 4/7 nach Therapie) wurden mit den Lysaten von *B. garinii* bzw. *B. afzelii* (= *B. burgdorferi*), sowie OspC und TT stimuliert. Jeweils einem Drittel der Kulturen wurden zusätzlich 10 ng/ml IL-12, bzw. 2 μ g/ml anti-IL-12 zugefügt. Nach 5-tägiger Inkubation wurde die IFN- γ Konzentration in den Zellkulturüberständen mittels Zytokin-ELISA bestimmt. Gleichzeitig wurde die jeweilige lymphoproliferation gemessen. Die IFN- γ Konzentration wurde in Relation zur jeweiligen Proliferation gesetzt (Sekretions-Index).

$$\text{Sekretions-Index} = \frac{\Delta \text{IFN-}\gamma}{\Delta \text{cpm} \times 10^{-3}}$$

$\Delta \text{IFN-}\gamma = \text{IFN-}\gamma (\text{Antigenstimulation}) - \text{IFN-}\gamma (\text{ohne Antigen})$.

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, daß sich durch Co-Stimulation mit IL-12 die IFN- γ Sekretion in vitro sowohl bei Stimulation mit *B. burgdorferi*-Antigen als auch mit TT signifikant steigern ließ. Durch Anwesenheit von anti-IL-12-Antikörpern wurde die IFN- γ -Sekretion nicht beeinflusst oder scheinbar erniedrigt. Auf das Proliferationsverhalten der PBMC hatten IL-12 bzw. anti-IL-12-AK keinen Einfluß. Die

IFN- γ -Sekretion unterschied sich nicht signifikant in Kulturen, die vor bzw. nach antibiotischer Therapie angelegt wurden.

4.3.4.2 IL-10 Sekretion bei Co-Stimulation mit IL-12

In den Kulturen mit exogen zugefügtem IL-12 konnte in den Borrelia-stimulierten Kulturen kein signifikanter Unterschied bezüglich der gemessenen IL-10 Konzentrationen festgestellt werden.

Zwar waren die IL-10 Konzentrationen in den Stimulationen mit *B. burgdorferi*-Lysat plus IL-12 im Durchschnitt 1,2-fach, bzw. 1,4-fach höher (\bar{x} 114 \pm 120 pg/ml) als in den Kulturen ohne IL-12 (\bar{x} 94 \pm 112 pg/ml) bzw. mit anti-IL12 (\bar{x} 79 \pm 81 pg/ml), jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. In den Stimulationen mit OspC plus IL-12 wurde eine durchschnittliche IL-10 Konzentration von 28 \pm 29 pg/ml gemessen, entsprechend dem 0,6-fachen der OspC Kulturen ohne IL-12 (\bar{x} 45 \pm 58 pg/ml), bzw. dem 0,8-fachen der Stimulationen mit OspC plus anti-IL-12 (\bar{x} 36 \pm 59 pg/ml). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz zu den *B. burgdorferi*-Stimulationen konnte unter TT-Stimulation ein deutlicher Anstieg der IL-10-Sekretion in den IL-12 Konditionen beobachtet werden. Die Konzentration in den Stimulationen mit TT plus IL-12 betrug im Durchschnitt 29 \pm 28 pg/ml, entsprechend dem 4,1-fachen der TT-Kulturen ohne IL-12 (\bar{x} 7 \pm 15 pg/ml, $p = 0,118$) bzw. dem 17,6-fachen der Stimulationen mit TT plus anti-IL-12-AK (\bar{x} 1,7 \pm 1,7 pg/ml, $p = 0,050$). Hinsichtlich des Proliferationsverhaltens ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellkulturen ohne bzw. mit IL-12 oder mit anti-IL12-AK.

Wie aus Abbildung 17 hervorgeht, zeigte sich kein signifikanter Unterschied der IL-10-Sekretion bei Ko-Stimulation mit IL-12 vor bzw. nach antibiotischer Therapie.

Wie für IFN- γ wurde auch für IL-10 ein Sekretionsindex errechnet, der die Proliferation der untersuchten Zellkulturen berücksichtigt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt:

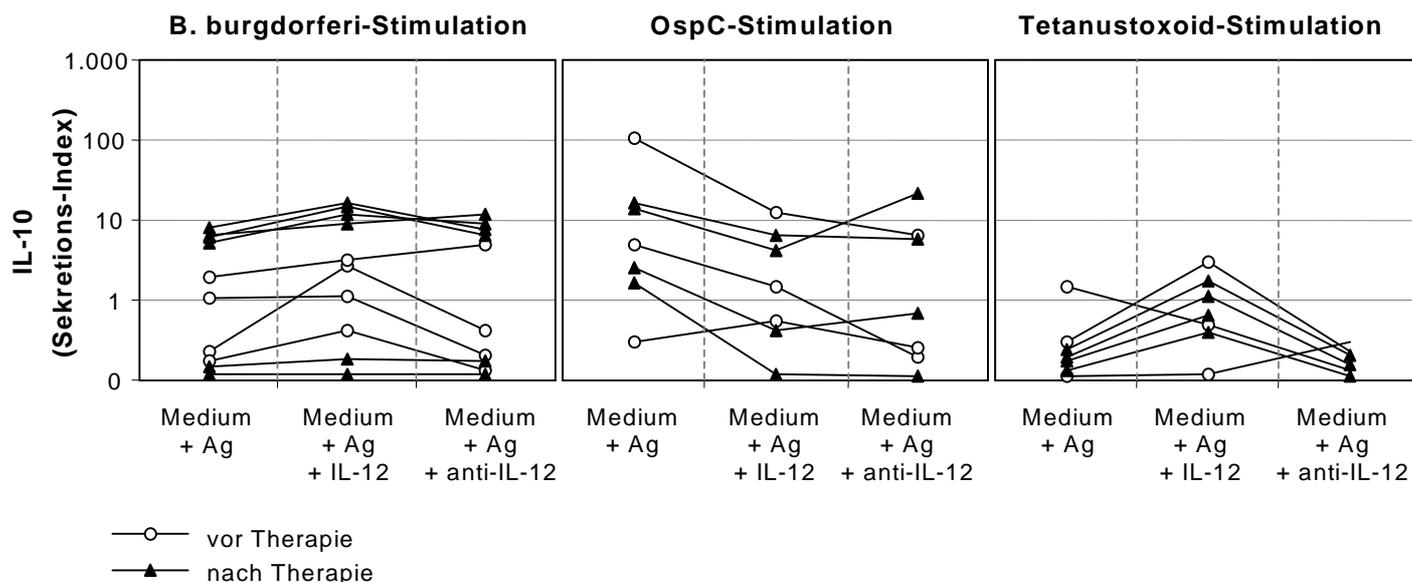


Abbildung 17: IL-10-Sekretion B. burgdorferi- und TT-spezifischer Zellen bei Co-Stimulation mit IL-12.

PBMC von 7 Patienten (3/7 vor und 4/7 nach Therapie) wurden mit *B. burgdorferi*-Lysat (*B. garinii* bzw. *B. afzelii*), sowie OspC und TT stimuliert. Je einem Drittel der Kulturen wurde zusätzlich 10 ng/ml IL-12, bzw. 2 µg/ml anti-IL-12-AK zugefügt. Nach 5-tägiger Inkubation wurden die IL-10 Konzentration der ZKÜ mittels Zytokin-ELISA bestimmt. Gleichzeitig wurde die jeweilige Lymphoproliferation gemessen. Die IL-10 Konzentration wurde in Relation zur jeweiligen Proliferation gesetzt (Sekretions-Index).

$$\text{Sekretions-Index} = \frac{\Delta \text{IL-10}}{\Delta \text{cpm} \times 10^{-3}}$$

$\Delta \text{IL-10} = \text{IL-10}(\text{Antigenstimulation}) - \text{IL-10}(\text{ohne Antigen})$

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, daß die IL-10 Sekretion in den *B. burgdorferi*-Stimulationen durch IL-12 Co-Stimulation nicht beeinflußt wird. TT-stimulierte PBMC sezernierten unter Zugabe von IL-12 signifikant mehr IL-10 als unter Zugabe von anti-IL12-AK. Die IL-10 Sekretion der IL-12-stimulierten PBMC vor bzw. nach antibiotischer Therapie war gleich.

4.3.4.3 IL-4 Sekretion bei Co-Stimulation mit IL-12

Eine relevante Sekretion von IL-4 konnte unter Co-Stimulation von IL-12 bzw. anti-IL-12-AK nicht detektiert werden.

4.3.4.4 IL-12 induziert gleichzeitige Sekretion von IFN- γ und IL-10 Borrelia-spezifischer Zellen

Um den Zusammenhang von IFN- γ und IL-10 Sekretion unter IL-12 Stimulation näher zu untersuchen wurden die IFN- γ bzw. IL-10 Sekretions-Indizes der einzelnen Kulturen miteinander verglichen (Abbildung 18):

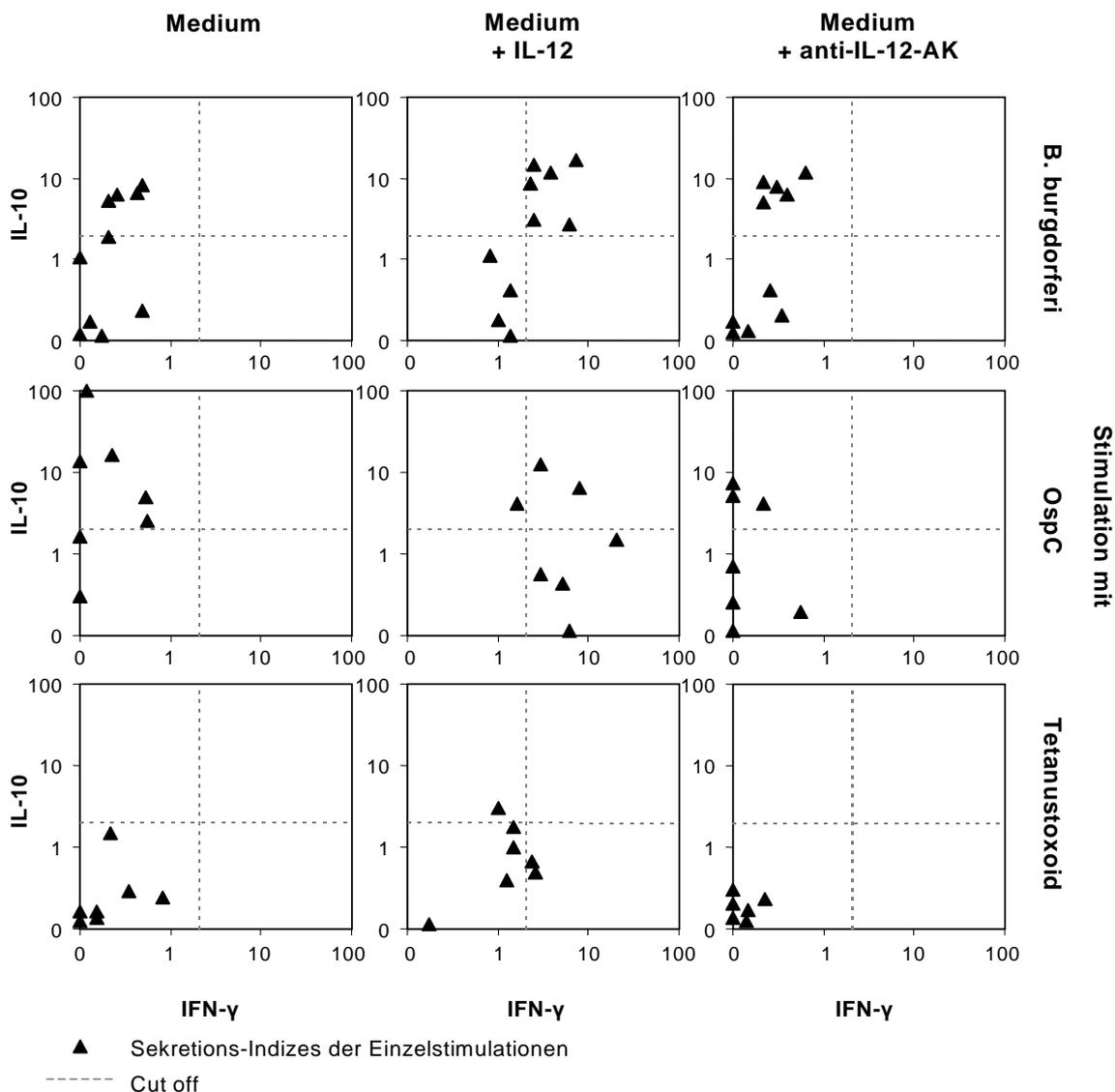


Abbildung 18: IL-12 induziert gleichzeitige IL-10- und IFN- γ -Sekretion in Kulturen Borrelia-spezifischer Zellen.

PBMC von 7 Lyme-Patienten wurden mit Lysat-Antigen (B. afzelii in 7 Fällen bzw. zusätzlich mit B. garinii in 3 Fällen), sowie OspC und Tetanustoxoid stimuliert. Jeweils einem Drittel der Kulturen wurde 10 ng/ml IL-12, bzw. 2g/ml anti-IL-12 zugegeben. Nach 5-tägiger Kultur wurde die IL-10-, bzw. IFN- γ -Sekretion im ZKÜ gemessen. Die Zytokin-Sekretion wurde in Relation zur jeweiligen Proliferation gesetzt (Sekretions-Index).

$$\text{IL-10-Sekretions-Index} = \frac{\Delta \text{IL-10}}{\Delta \text{cpm} \times 10^{-3}} \quad \Delta \text{IL-10} = \text{IL-10 (Antigenstimulation)} - \text{IL-10 (ohne Antigen)}$$

$$\text{IFN-}\gamma\text{-Sekretions-Index} = \frac{\Delta \text{IFN-}\gamma}{\Delta \text{cpm} \times 10^{-1}} \quad \Delta \text{IFN-}\gamma = \text{IFN-}\gamma \text{ (Antigenstimulation)} - \text{IFN-}\gamma \text{ (ohne Antigen)}$$

Dabei wurde beobachtet, daß unter Stimulation mit *B. burgdorferi* bzw. mit OspC die in Relation zur Proliferation gesetzte Sekretion, d.h. der Sekretionsindex für beide Zytokine höher lag, als unter Stimulation mit TT. Interessanterweise konnte unter Zugabe von IL-12 in 6/10 *B. burgdorferi*- sowie in 2/7 OspC-Stimulationen eine gleichzeitige Sekretion von IL-10 und IFN- γ beobachtet werden, welches sich nicht in den Konditionen mit alleiniger Antigen-Stimulation oder nach Zugabe von anti-IL-12-AK beobachten lies. Unabhängig von Co-Stimulation mit IL-12 oder anti-IL-12-AK konnte unter TT-Stimulation keine gleichzeitige Sekretion von IL-10 und IFN- γ nachgewiesen werden (Abbildung 18).

5 Diskussion

Nach einer Infektion mit *B. burgdorferi* kann es häufig trotz einer deutlichen humoralen Immunantwort zur Entwicklung einer systemischen, eventuell chronischen Lyme-Borreliose kommen. Es gibt Hinweise darauf, daß dies unter anderem dadurch bedingt ist, daß *B. burgdorferi*, sich dem Angriff des Immunsystems durch vielfältige Mechanismen entziehen kann, z.B. durch eine variable Expression von Outer Surface Proteinen. Um das Phänomen der unterschiedlichen Expression von Borrelienproteinen näher zu untersuchen, sollte in dieser Studie daher die humorale und zelluläre Immunantwort auf die immunodominanten Borrelienproteine OspC und Osp17, sowie auf die Borrelia-Proteine p39 und p41 bei pädiatrischen Patienten mit Lyme-Borreliose untersucht werden.

5.1 Humorale Immunantwort auf *B. burgdorferi*

Da die humorale Immunantwort bei der Abwehr einer Infektion mit *B. burgdorferi* eine herausragende Rolle zu spielen scheint (Schaible et al. 1989, Schaible et al. 1990, Schaible et al. 1991, Barthold et al. 1996, Fikrig et al. 1996), wurden in dieser Studie zunächst die serologischen Untersuchungsergebnisse von 54 pädiatrischen Patienten mit Lyme-Borreliose beschrieben.

5.1.1 Antikörperuntersuchung im Serum zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

"Der serologische Befund bei Lyme-Borreliose steht in starker Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung und der Dauer der klinischen Symptome." (Wilske et al. 1991).

Bisherige Untersuchungen zur humoralen Immunantwort auf *B. burgdorferi* wurden bisher allerdings vorwiegend bei Erwachsenen durchgeführt. So konnte beobachtet werden, daß das Erythema migrans aufgrund der kurzen Inkubationszeit häufig seronegativ ist (bis zu 50%, Wilske et al 1991). Falls Antikörper nachweisbar sind, sind es vor allem IgM-Antikörper. Seronegative Befunde sind auch in den ersten Wochen bei Neuroborreliose nicht selten zu finden (Wilske et al. 1991, Hansen et al 1990, Stiernstedt et al. 1985). IgM-Antikörper überwiegen in den ersten zwei Wochen nach Beginn der klinischen Symptomatik mit 71% und sind mit 16% nur selten jenseits der sechsten Krankheitswoche nachweisbar (Wilske et al. 1989, Wilske et al. 1991).

Sowohl IgM-, als auch IgG-Antikörper werden in den ersten 2 Krankheitswochen von 29% der Patienten, zwischen 3 und 6 Krankheitswochen von 24% und jenseits der 6. Krankheitswoche von 14% der Patienten gebildet (Wilske et al. 1991). Bei Spätmanifestationen sind in der Regel hohe IgG-Antikörper nachweisbar. Eine isolierte Bildung von IgM-Antikörpern findet sich hier in nur 2% der Fälle (Wilske et al. 1989, Wilske et al. 1991). Insgesamt signifikant erhöhte Antikörper-Titer fanden sich in einer Studie des Max-von-Pettenkofer-Instituts bei 20-50% der Patienten mit EM (davon 50-90% IgM und 10-50% IgG), bei 70-90% der Patienten mit Lyme-Neuroborreliose (15-70% IgM und 50-100% IgG) und bei 90-100% der Patienten mit chronischer Lyme-Borreliose (3-7% IgM und 90-100% IgG).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie, bei der ausschließlich Seren von Kindern untersucht wurden, stimmen größtenteils gut mit den bisherigen Untersuchungen zur humoralen Immunantwort auf *B. burgdorferi* Infektionen und zur serologischen Diagnostik bei Erwachsenen überein:

Serologische Ergebnisse bei EM:

Von den pädiatrischen Patienten mit EM waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung - bei einer allerdings geringen Fallzahl von 4 Patienten - die Hälfte (2/4) seronegativ, was den Ergebnissen bei Erwachsenen entspricht (s.o.). Bei 2/4 Patienten waren sowohl IgM-, als auch IgG-Antikörper nachweisbar.

Positiver Antikörpernachweis:

Wie auch bei den erwachsenen Patienten mit akuter systemischer Borreliose (BL, NB, LA) bildeten 90,1% (40/44) der Kinder mit akuter systemischer Borreliose nachweisbare IgM- und/oder IgG-Antikörper zum Zeitpunkt der Diagnosestellung:

Positiver IgM-AK Nachweis:

Ein alleiniger IgM-AK-Nachweis konnte bei 34,1% (15/44) der Patienten mit akuter systemischer Borreliose beobachtet werden: 2/7 der Patienten mit BL und 13/32 (40,6%) der Patienten mit NB bildeten ausschließlich IgM-Antikörper. Sofern bekannt, lag die Inkubationszeit in diesen Fällen bei 2-4 Wochen. Diese Daten sind vergleichbar mit den Ergebnissen bei Erwachsenen für diesen Zeitraum: 42-25% in Abhängigkeit von der Dauer der Symptome (Wilske et al 1991).

Positiver IgG- und IgM-AK Nachweis:

Sowohl IgM-, als auch IgG-Antikörper bildeten 38,6% (17/44) aller Patienten unserer Studie mit akuter systemischer Borreliose: 15/32 (46,8%) der Patienten mit NB und 3/7 der Patienten mit LA. Die Inkubationszeit war in 22/44 Fällen erfassbar und betrug in diesen Fällen durchschnittlich 5 (2-12) Wochen, im Durchschnitt also länger, als in der Gruppe der Patienten mit ausschließlicher IgM-Bildung. Im Gegensatz dazu konnte bei Erwachsenen, bei denen sich die LB nach einer vergleichbar langen Inkubationszeit manifestierte, seltener (24%, Wilske et al 1991) eine gleichzeitige IgM- und IgG-Antikörperbildung beobachtet werden.

IgM-AK bei Neuroborreliose:

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß insgesamt bei 31/35 (88,6%) pädiatrischen Patienten (28/32 = 89,6% bei NB) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung IgM-AK nachweisbar waren. Die eruierten Inkubationszeiten lagen im Bereich von durchschnittlich 3,8 Wochen bei fehlender IgG-Serokonversion und bei durchschnittlich 2-3 (1-12) Monaten bei gleichzeitigem IgG-Nachweis. Entsprechend unseren Beobachtungen ist der Nachweis von borrelienspezifischen IgM-AK im Serum besonders bei der Diagnostik der Neuroborreliose im Kindesalter ein Leitsymptom. Dagegen steht die Prävalenz von IgM-AK im Serum bei Erwachsenen nur in den ersten 2 Krankheitswochen im Vordergrund. (Wilske et al. 1991).

Positiver IgG-AK Nachweis:

Ein alleiniger IgG-AK-Nachweis konnte nur bei 18,2% (8/44) aller Kinder mit akuter systemischer Borreliose geführt werden. 4/7 der Patienten mit BL, 1/32 Patient mit NB und 3/5 der Patienten mit LA bildeten ausschließlich IgG-Antikörper. Die Inkubationszeiten lagen, soweit eruiert, in diesen Fällen im Bereich von mehreren Monaten. Im Gegensatz dazu zeigen erwachsene Patienten nach einer Krankheitsdauer ≥ 6 Wochen zu 84% eine ausschließliche IgG-AK-Bildung (Wilske et al 1991).

IgG-Titer bei Patienten mit bzw. ohne begleitendes EM:

Interessanterweise konnten wir beobachten, daß Patienten ohne krankheitsassoziiertes Erythema migrans signifikant höhere IgG-Titer bildeten, als

Patienten, bei denen ein EM begleitend auftrat (Tabelle 4). Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die längeren Inkubationszeiten in Fällen ohne Auftreten eines EM sein.

Seronegative Befunde:

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ließen sich bei 12,5% (6/48) der untersuchten Patienten mit lokaler oder systemischer Borreliose im Serum keine borrelienspezifischen Antikörper, bei weiteren 10,4% (5/48) ausschließlich grenzwertige IgM-Antikörper nachweisen. Das Ausbleiben einer adäquaten humoralen Immunantwort könnte durch folgende Beobachtungen erklärt werden:

2 dieser 11 Patienten hatten ein Erythema migrans. Bei kurzer Inkubationszeit kann die Diagnosestellung noch vor Einsetzen einer nachweisbaren Antikörperproduktion erfolgt sein, wie schon beschrieben (50-80% seronegative Borreliosen des Stadium I, Wilske et al. 1991). Zudem handelt es sich um eine lokale Manifestation. Die für die AK-Produktion erforderliche Systeminvasion ist offensichtlich noch nicht erfolgt.

7/11 (63,6%) Patienten litten jedoch an einer Neuroborreliose und 2/11 an einem Lymphozytom, also systemischen Manifestationen. Obwohl bei diesen Patienten Inkubationszeiten von bis zu 6 Wochen eruiert waren, handelt es sich in diesen Fällen offensichtlich um systemische Infektionen mit nicht nachweisbarer Antikörperbildung bzw. nur geringer humoraler Reaktion auf den Erreger. Jedoch wird auch bei Erwachsenen Patienten mit BL eine Antikörperbildung in nur 58,5% (Strle et al. 1996) bis 74% (Asbrink et al. 1989) der Fälle angegeben. Möglicherweise ist die Konzentration von zirkulierenden *Borrelia burgdorferi*-Bakterien in diesen Fällen zu gering gewesen, um eine deutliche Immunreaktion hervorzurufen.

5.1.2 Humorale Immunantwort im Verlauf der Infektion

Um den Verlauf der humoralen Immunantwort auf eine Infektion mit *B. burgdorferi* zu beschreiben, wurden die serologischen Befunde von 29 Kindern in einer Nachbeobachtung über einen Zeitraum von bis zu 3 Jahren erfaßt.

IgG-Antikörperbildung im Verlauf:

- Bei 27,6% (8/29) der Patienten bestand zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein deutlich erhöhter IgG-Titer (> 100 U/ml). Bei diesen Patienten blieben die hohen IgG-Titer nach erfolgter Therapie weiterhin nachweisbar (Abbildung 2a, S. 42). Von

einer protektiven Immunität gegen die verursachende Spezies von *B. burgdorferi* ist in diesen Fällen auszugehen (Schaible et al. 1991, Fikrig et al. 1996).

- Weitere 31% (9/29) der Patienten hatten initial niedrige IgG-Titer (< 100 U/ml, Abbildung 2b, S. 42). Bei 6/9 Kindern ließ sich während des Nachbeobachtungszeitraumes ein deutliches Absinken der Antikörperproduktion feststellen. 2/9 Patienten, die initial IgG-Titer von 6 bzw. 10 U/ml hatten, waren 5 bis 6 Monate nach Therapiebeginn seronegativ. Bei 3 weiteren Patienten fiel der IgG-Antikörper-Titer bis auf ein grenzwertiges Niveau zurück. Von den letztgenannten 5 Kindern hatte ein Kind ein EM, 4 Kinder hatten eine systemische Borreliose.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß in Fällen einer initial niedrigen IgG-Produktion die humorale Reaktivität gegen *B. burgdorferi* nach erfolgreicher Therapie bald verloren gehen kann. Reinfektionen konnten von uns beobachtet werden und sind in der Literatur mehrfach beschrieben (Salazar et al. 1993, Christen et al. 1993, Dattwyler et al. 1988b). Da keine sichere Kreuzimmunität zwischen den verschiedenen humanpathogenen *Borrelia*-Spezies besteht (Johnson et al. 1988), kann es sich um Infektionen mit einer anderen Spezies handeln. In unserer Studie konnte jedoch gezeigt werden, daß in Fällen einer initial niedrigen IgG-AK-Bildung die Entwicklung einer bleibenden humoralen Immunität offensichtlich ausbleiben kann. Bei erneutem Erregerkontakt besteht hier also auch ein erhöhtes Risiko einer Reinfektion mit der selben *Borrelia*-Spezies.

Zum anderen konnten wir beobachten, daß initial hohe IgG-Titer (>100 U/ml) über einen langen Zeitraum hoch bleiben. In diesen Fällen ist von einer protektiven humoralen Immunität gegenüber der entsprechenden *Borrelia*-Spezies auszugehen. Eine über Jahre hochtitrig bestehende Immunantwort vom IgG-Typ wird von einigen Autoren als Resultat von wiederholten Antigenkontakten bzw. asymptomatischen Reinfektionen beschrieben. Letztlich sind diese Phänomene noch nicht ausreichend erklärt.

IgM-Antikörperbildung bei Serokonversion zu IgG (Abb 3 a,b, S. 43):

- 10/17 Patienten, bei denen initial IgG-AK nachweisbar waren, bildeten zum Untersuchungszeitpunkt (noch) IgM. Bei allen Kindern konnte ein Absinken der IgM-Titer beobachtet werden. Bei 7 Kindern waren bereits keine IgM-AK mehr nachweisbar.
- Von 10 Kindern mit initial positiven IgM-AK konnten nach 6 Monaten bei 3 Kindern

keine IgM-AK, bei 5 Kindern grenzwertige und bei nur 2 Kindern positive IgM-Titer bestimmt werden.

Daraus läßt sich schließen, daß bei Serokonversion zu IgG die IgM-Antikörperbildung nachläßt und schließlich ausbleibt. Allerdings kommt es im Gegensatz z.B. zu Virusinfektionen im Verlauf von Infektionen mit *B. burgdorferi* nur zu einem sehr langsamen, z.T. über Monate andauerndem Absinken der IgM-AK.

IgM-AK Bildung bei fehlender Serokonversion zu IgG (Abbildung 3c):

- Bei 11/29 (37,9%) Patienten, die initial IgM positiv waren, fand während eines Beobachtungszeitraumes von 3 Monaten bis 2 Jahren nach antibiotischer Therapie keine IgG-Serokonversion statt (1 Kind hatte ein EM, 10 Kinder eine NB).

In allen Fällen war nach spätestens 2 Jahren die IgM-Antikörperbildung unter den Grenzwert abgesunken. Die Therapie erfolgte in diesen Fällen durchschnittlich 4 Wochen nach dem erinnerlichen Zeckenstich, bzw. innerhalb von Tagen nach Symptombeginn.

Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, daß eine frühzeitige Therapie die Antigen(=Borrelien)-Konzentration im Wirt so drastisch reduziert, daß dem Immunsystem nicht mehr ausreichend Antigen zur Verfügung steht, um einen Immunglobulinklassen-Switch zu einer IgG-Antikörperproduktion zu vollziehen. In den eruierbaren Fällen lag die durchschnittliche Inkubationszeit bei 3,8 Wochen im Gegensatz zu durchschnittlich 8 Wochen bei stattfindender IgG-Serokonversion.

Denkbar wäre jedoch auch eine Unterdrückung des Immunglobulin-Klassen-Switch von IgM zu IgG durch eine immunmodulatorische Beeinflussung durch den Erreger selbst. (s.u.).

In unserer Studie konnten wir in einzelnen Fällen eine Persistenz der IgM-AK bis zu 24 Monaten beobachten. In diesen Fällen könnte eine lange Zeit fortdauernde IgM-AK Bildung durch die Persistenz des Erregers bzw. von Bakterienfragmenten bedingt sein. In einer frühen Studie beobachteten Craft et al. bei Patienten mit chronischer Borreliose eine neu auftretende IgM-Antwort in späten Stadien, die gegen zuvor nicht erkannte Epitope von *B. burgdorferi* gerichtet waren. Dies führte zur Hypothese, daß Borrelien, die im Körper persistieren, zu einem späteren Zeitpunkt, unter dem Druck der humoralen Immunantwort neue Proteine exprimieren und dadurch auch eine erneute IgM-Antikörper Antwort hervorrufen (Craft et al. 1986, Schwan et al. 1995, De

Silva und Fikrig 1997, Schwan und Hinnebusch 1998). Bei unseren Patienten wurde jedoch eine adäquate antibiotische Therapie durchgeführt und letztendlich waren alle IgM-Titer im Verlauf rückläufig und in keinem Fall konnte eine erneute Bildung von IgM-Antikörpern nach einer Phase der IgM-Negativität beobachtet werden.

Die ausbleibende Serokonversion ist ein Phänomen, das bisher in der Literatur nicht beschrieben worden ist. Im Kindesalter scheint nach unserer Datenlage ein Ausbleiben der IgG-AK Bildung nicht selten vorzukommen. In diesen Fällen kann nach erfolgreicher antibiotischer Therapie die AK-Bildung komplett erliegen, sodaß dann keine bleibende humorale Immunität vorzuliegen scheint.

5.2 Zelluläre Immunreaktion bei pädiatrischen Patienten mit akuter Lyme-Borreliose

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der zellulären Immunantwort auf immunrelevante Proteine von *B. burgdorferi* bei Kindern mit verschiedenen Stadien der Lyme-Borreliose. Mehrere Arbeitsgruppen haben einheitlich die signifikante T-zelluläre Reaktivität auf *Borrelia*-Proteine in Abhängigkeit der klinischen Manifestation auf Stimulation mit *B. burgdorferi* beschrieben. Bisherige Untersuchungen zeigten in der Frühphase der Infektion die Entwicklung einer zellulären Immunantwort, die der humoralen Immunantwort vorausgehen kann (Dattwyler et al. 1988c). Weitere Hinweise darauf, daß eine zelluläre Immunreaktion gegen *B. burgdorferi* in der Pathogenese der Infektion frühzeitig eine Rolle spielt, erbrachten histologische Untersuchungen: In Biopsien von Patienten mit Erythema migrans konnten T-Zellen nachgewiesen werden (Büchner et al. 1987). Im Tiermodell wurde gezeigt, daß nur T-Zellen aus *B. burgdorferi*-infizierten, nicht jedoch T-Zellen aus naiven Mäusen nach 4-tägiger Inkubation spezifisch auf *B. burgdorferi* reagierten. Das Ausmaß der Reaktivität war hierbei jedoch von der Antigenkonzentration abhängig (Schaible et al. 1989b). Signifikante Unterschiede in der *B. burgdorferi*-spezifischen Lymphoproliferation wurden auch zwischen erwachsenen Lyme-Patienten und seronegativen Kontrollen (Dressler et al. 1991, Zoschke et al. 1991, Krause et al. 1992), sowie bei pädiatrischen Patienten mit Lyme-Arthritis und seronegativen Patienten mit Arthritis anderer Genese (Huppertz et al. 1996) beobachtet. Ebenso zeigte sich eine signifikante zelluläre Reaktivität auf *B. burgdorferi* bei seronegativen Patienten mit Lyme-Borreliose (Dattwyler et al. 1988b).

Im Gegensatz zum Tiermodell wurde jedoch in verschiedenen Studien bei seronegativen Kontrollen zum Teil ebenfalls eine gewisse zelluläre Reaktivität auf *B. burgdorferi* festgestellt (Zoschke et al. 1991, Roessner et al. 1994, Huppertz et al. 1996). Ergänzend zu den bisherigen Untersuchungen, die größtenteils an Erwachsenen, bzw. pädiatrischen Patienten mit Lyme-Arthritis durchgeführt wurden, sollten in dieser Studie pädiatrische Patienten mit verschiedenen Manifestationen der frühen, akuten Lyme-Borreliose, sowie die Reaktivität auf einzelne immunodominante Proteine von *B. burgdorferi*, insbesondere OspC und Osp17, untersucht werden.

5.2.1 Zelluläre Immunreaktion auf *B. burgdorferi*-Lysate

In der vorliegenden Studie konnten 50 T-Zell Assays von 35 Kindern mit Lyme-Borreliose und von insgesamt 16 Kontrollen durchgeführt werden. Die Lysate stammten von *B. garinii* und *B. afzelii*. Diese beiden Spezies wurden am häufigsten im Max-von-Pettenkofer-Institut München isoliert (Wilske et al. 1996b).

Wir konnten bei Patienten mit Lyme-Borreliose im Vergleich zu seronegativen Kontrollen eine signifikant erhöhte Lymphoproliferation auf Lysate von *B. burgdorferi* beobachten. Diese borrelienspezifische Reaktivität wurde, wie bereits von anderen Arbeitsgruppen bei Kindern mit Lyme Arthritis beschrieben (Dressler et al. 1991, Zoschke et al. 1991, Krause et al. 1992, Huppertz et al. 1996), in unserer Arbeit auch bei Kindern mit anderen Manifestationen der akuten generalisierten Borreliose und ebenso bei (seronegativen) Kindern mit Erythema migrans im Vergleich zu altersentsprechenden Kontrollen festgestellt.

Weiterhin wurden die vorherrschenden reaktiven Lymphozyten-Subpopulationen untersucht: Der Hauptanteil der proliferierenden T-Zellen bestand aus CD4+ Zellen. Dies wurde auch von anderen Autoren beobachtet (Huppertz et al. 1996, Rutkowski et al. 1997).

Es konnten keine wesentlichen Unterschiede in der Reaktivität auf beide Lysate beobachtet werden, was vermutlich daran liegt, daß zahlreiche Borrelienantigene zwischen den einzelnen Spezies kreuzreaktive Epitope aufweisen (Bruckbauer et al. 1992). Eine Infektion mit mehreren Spezies ist in Einzelfällen nicht auszuschließen, erscheint aber als Ursache in allen Fällen unwahrscheinlich.

Es gab in der Kontrollgruppe einzelne Individuen, deren Lymphoproliferation sich nicht von der Patientengruppe unterschieden. Eine erhöhte Lymphoproliferation auf *B.*

burgdorferi von seronegativen Personen wurde auch von anderen Studiengruppen beobachtet (Zoschke et al. 1991, Roessler et al. 1994). Verantwortlich hierfür ist wahrscheinlich die Verwendung von ganzen, sonifizierten Borrelien, die eine Reihe von Antigenen, wie zum Beispiel Heat-Shock-Proteine (HSP) enthalten, die mit anderen bakteriellen Antigenen kreuzreagieren (Hansen et al. 1988, Craft et al., Bey et al. 1995). Andererseits konnte diese Reaktivität vor allem bei älteren Kontrollen beobachtet werden. So lagen die durchschnittlichen Proliferationsraten von seronegativen Kontrollpatienten, die älter als 10 Jahre waren fast doppelt so hoch, wie die durchschnittlichen Proliferationsraten der Kontrollen < 10 Jahre. Desweiteren wurde bei keinem der Kontrollpatienten eine deutliche Proliferation ($>10.000 \Delta\text{cpm}$) auf beide Lysate gleichzeitig beobachtet, wie sie bei 68% (24/35) der Patienten beobachtet werden konnte.

5.2.2 Zelluläre Immunreaktion auf rekombinante Borrelia-Proteine

Eine relevante Lymphoproliferation auf Borrelia-Lysat-Antigene konnte in verschiedenen Studien nicht nur bei seropositiven Patienten, sondern auch bei manchen seronegativen, gesunden Kontrollen – insbesondere bei älteren Kindern und Erwachsenen – beobachtet werden. Da die Borrelia-Lysat-Antigene eine Mischung aus den verschiedenen borrelienspezifischen Proteinen aber auch aus unspezifischen Proteinen wie die LPS darstellen, war es von Interesse, die zelluläre Reaktivität auf einzelne Borrelia-Proteine, die in rekombinanter Form vorlagen, zu analysieren.

5.2.2.1 Zelluläre und humorale Immunreaktion auf OspC

Ein wichtiges immundominantes Protein, das häufig und früh exprimiert wird ist das Outer Surface Protein OspC. Da während der Blutmahlzeit der Zecke OspA herunter- und OspC hochreguliert wird (Schwan et al. 1995, Fingerle et al. 1998), wird der Wirtsorganismus mit OspC-exprimierenden Spirochäten infiziert. Dies führt zu einer primären humoralen Immunreaktion, die vorwiegend gegen OspC gerichtet ist (Wilske und Preac-Mursic 1993, Wilske et al. 1994, Fung et al. 1994, Hauser et al. 1997). Die zelluläre Immunreaktion auf OspC ist von besonderem Interesse, da sich OspC als effektive Vakzine im Tiermodell herausgestellt hat (Preac-Mursic et al. 1992, Gilmore et al. 2001, Scheiblhofer et al. 2003). Zudem wurde beobachtet, daß eine passive Immunisierung mit OspC einen fördernden therapeutischen Effekt auf die Rückbildung

der Lyme-Arthritis in SCID-Mäusen bewirkte (Zhong et al. 1997).

In unserer Studie konnten Lymphoproliferationen auf OspC bei 37 Kindern mit Lyme-Borreliose untersucht werden. 35,1% (13/37) dieser Patienten wiesen im Immunoblot OspC-spezifische IgM- und/oder IgG-Antikörper auf: Bei 24,3% (9/37) der Patienten waren nur IgM-, bei 21,6% (8/37) der Patienten waren nur IgG- und bei 15,6% (5/37) waren sowohl IgG-, als auch IgM-Antikörper nachweisbar. Diese Häufigkeiten stimmen mit den Untersuchungen bei erwachsenen Patienten mit akuter Neuroborreliose überein: 27% der Patienten bildeten IgM-Antikörper und 17% der Patienten IgG-Antikörper gegen OspC (Hauser et al. 1997).

Im Vergleich zur humoralen war die zelluläre Immunantwort auf OspC bei unseren Patienten deutlich stärker ausgeprägt: So konnte insgesamt bei 89,2% (33/37) der Lyme Patienten eine positive lymphoproliferative Reaktion auf OspC beobachtet werden, wobei in 67,7% (25/37) der Patienten die Reaktion deutlich ausgeprägt, bei 21,6% (8/37) der Patienten die Reaktion nur schwach ausgeprägt war. Bei den verschiedenen klinischen Manifestationen konnte kein Unterschied in der Ausprägung der Lymphoproliferation beobachtet werden. Von den Patienten mit deutlich positiver zellulärer Reaktion wiesen 64% (16/25) keine OspC-spezifischen Antikörper auf. Die Intensität der Proliferation auf OspC unterschied sich insgesamt nicht statistisch signifikant zwischen OspC-AK-positiven und -negativen Patienten, obwohl bei Patienten mit kutanen Manifestationen die durchschnittliche Proliferation auf OspC bei OspC-AK-positiven Kindern im Durchschnitt höher lag, als bei OspC-AK-negativen.

Insgesamt unterschied sich die durchschnittliche Lymphoproliferation auf OspC bei allen Patienten mit systemischer Borreliose signifikant von den Kontrollen. Allerdings wurden im Eizelfall immer wieder Proliferationen beobachtet, die den festgelegten Cut off-Wert nicht überschritten. Keiner der Kontrollpatienten, die jünger als 10 Jahre waren, zeigte eine über dem Cut off gelegene zelluläre Reaktion auf OspC. Bei den älteren Kontrollpatienten > 10 Jahre ließ sich in 3/5 Fällen eine schwach positive Reaktion finden, die jedoch deutlich unter dem Durchschnitt der Reaktivität der Lyme-Patienten lag. Das Phänomen, daß eine positive zelluläre Immunreaktion auf Borrelienproteine auch bei seronegativen Kontrollpatienten zu beobachten ist, ließ sich also nicht nur bei den Lysat-Antigenen, sondern auch bei OspC beobachten, wobei die 3/15 Kontrollpatienten, die auf OspC reagierten älter als 10 Jahre waren. Dieses Phänomen ist allerdings bei OspC deutlich geringer ausgeprägt als bei den Lysat-

Antigenen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, daß OspC immunodominante Epitope besitzt, die in manchen Fällen zu einer Kreuzreaktivität führen können, oder eine polyklonale Stimulation provozieren kann. Außerdem ist ein früherer Antigenkontakt auch bei seronegativen Kontrollpersonen nicht gänzlich ausgeschlossen (Kap. 5.1).

Insgesamt konnten wir in unserer Studie zeigen, daß OspC ein potenter B- und T-Zell-Stimulus ist (Kap. 4.3 Zytokinsekretion *B. burgdorferi*-spezifischer Lymphozyten).

5.2.2.2 Zelluläre und humorale Immunreaktion auf Osp17

Im Gegensatz zu OspC wird auf Osp17 in frühen Stadien der akuten Lyme-Borreliose nicht so häufig eine humorale Immunreaktion beobachtet (Hauser et al 1997, Wilske et al. 1999). Nur bei etwa 27% erwachsener Patienten mit akuter disseminierter, jedoch bei etwa 95% der Patienten mit chronischer Lyme-Borreliose konnte mittels Immunoblot Analyse eine Antikörperbildung gegen Osp17 beobachtet werden (Hauser et al. 1997, Wilske et al. 1999). Die serologischen Untersuchungen unserer pädiatrischen Patienten erbrachten vergleichbare Ergebnisse: Nur bei 21,2% (7/33) der Kinder, bzw. in 20,9% (9/43) der untersuchten Blutproben waren Osp17-spezifische Antikörper nachweisbar. Es handelte sich hierbei ausschließlich um IgG-Antikörper. Da IgM-Antikörper gegen Osp17 in der Regel nicht nachgewiesen werden können, wurden auch in unserer Studie, in Analogie zu den Beobachtungen bei erwachsenen Patienten, nur IgG-Antikörper gegen Osp17 getestet.

Im Gegensatz zu den Proliferationsdaten von OspC lagen die Osp17-spezifischen Proliferationswerte sowohl bei den Patienten, als auch bei den Kontrollen deutlich niedriger. Trotzdem konnte in unserer Studie bei den Lyme-Patienten gegenüber den Kontrollen im Durchschnitt eine signifikant höhere Proliferationsrate ermittelt werden ($p = 0,001$). Allerdings wurde nur bei 16,3% (7/43) der untersuchten Proben eine zelluläre Reaktivität von $> 1.000 \Delta\text{cpm}$ (Kap. 3.3.3 Material und Methoden) beobachtet. Darüber hinaus konnte nur in 3/9 Blutproben mit positiven Osp17-AK auch eine zelluläre Reaktivität beobachtet werden. Möglicherweise stellt Osp17 in diesem Zusammenhang einen weniger starken T-Zell-Stimulus dar, als beispielsweise OspC. Insgesamt stimmen unsere Beobachtungen zur humoralen und zellulären Immunreaktion mit den bisherigen in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen überein. Es ist jedoch bemerkenswert, daß zwar einige unserer Patienten mit NB Antikörper gegen Osp17 aufwiesen und auch (gering) proliferierten, jedoch

gegensätzlich zu den Beobachtungen anderer Autoren unsere Patienten mit LA, die im Durchschnitt längere Inkubationszeiten vorweisen, gegen Osp17 weder AK aufwiesen, noch proliferierten. Hierbei könnte es sich jedoch einerseits um eine zufällige Beobachtung handeln, da eine statistische Auswertung bei zu geringer Fallzahl nicht möglich war. Andererseits könnten die geringen Proliferationen daher rühren, daß es sich bei Osp17 in der vorliegenden rekombinanten Form um einen zu schwachen T-Zell-Stimulus handeln.

Anhand unserer Daten lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen: Zunächst konnten wir die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen zur humoralen Immunabwehr auf Osp17 bei Erwachsenen auch für pädiatrische Patienten bestätigen. Weiterhin konnten durch unsere Studie erstmals Daten zur zellulären Immunabwehr auf Osp17 bei pädiatrischen Patienten dargestellt werden. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, daß die zelluläre Reaktivität auf Osp17 bei Kindern mit akuter Lyme-Borreliose selten und sehr viel geringer ausgeprägt ist, als die Reaktion auf OspC.

5.2.3 Zelluläre und humorale Immunreaktion auf die rekombinanten Borrelia-Proteine p39 und p41

Das Membranprotein p39 wird ähnlich wie Osp17 häufiger in den späten Infektionsstadien von *B. burgdorferi* exprimiert. So konnte man bei erwachsenen Patienten mit akuter Neuroborreliose nur in 41% und im Gegensatz dazu bei Patienten mit chronischer Lyme-Borreliose jedoch in 83% der Fälle p39-spezifische Antikörper nachweisen. Vergleichbare Ergebnisse lieferte auch unsere Studie: Nur in 18,8% (6/32) der untersuchten Proben konnte eine relevante Proliferation gemessen werden, und nur 28,6% (10/35) der Patienten wiesen p39-spezifische Antikörper auf. Diese Ergebnisse charakterisieren p39 als ein Antigen, das bei der akuten Infektion mit *Borrelia burgdorferi* nur eine untergeordnete Rolle sowohl bei der humoralen, als auch zellulären Immunantwort spielt. Unterstützt werden unsere Beobachtungen durch die Tatsache, daß im Tierversuch die Immunisierung mit p39 im Vergleich zu OspC keinen protektiven Effekt bewirkte (Gilmore et al. 1996).

Das Flagellum-assoziierte Protein p41 ist ein *Borrelia*-Antigen, das einerseits häufig zu einer initialen IgM- und IgG-Antikörperbildung führt. Zudem ist der vorwiegende Anteil

der intrathekalen Antikörper-Synthese bei Patienten mit akuter Neuroborreliose gegen p41 gerichtet (Wilske et al. 1991). Andererseits ruft p41 aber auch in späteren Stadien der Infektion (bei 40-50%) der Patienten eine Antikörperbildung hervor (Craft et al. 1986). In unserer Studie konnte bei 68,8% (33/48) aller Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eine Reaktivität gegen p41 (IgM- und/oder IgG-Antikörper) im Immunoblot im Serum nachgewiesen werden. Diese Daten entsprechen somit annähernd den in der Literatur angegebenen Ergebnissen: In der Studie von Craft et al. waren bei 50% (6/12) der Patienten 3 Wochen nach Erkrankungsbeginn und bei 83,3% (10/12) der Patienten 6 Wochen nach Erkrankungsbeginn p41-spezifische AK zu beobachten (Craft et al. 1986).

Im Vergleich zur humoralen Immunantwort konnte auch bei der Untersuchung der zellulären Immunreaktion eine Reaktivität in der Hälfte der Fälle (4/8) beobachtet werden. Ähnlich wie bei der Immunantwort auf OspC, Osp17 und p39 konnte auch für p41 keine sichere Übereinstimmung von humoraler und zellulärer Immunantwort beobachtet werden.

5.2.4 Lymphoproliferation auf Tetanustoxoid

Das Recall-Antigen Tetanustoxoid wurde in der vorliegenden Studie als Kontroll-Antigen verwendet. In einer früheren Studie verhielten sich T-Zellen gesunder Kontrollen und Patienten mit Lyme-Borreliose gleich hinsichtlich ihrer zellulären Reaktivität gegen Tetanustoxoid (Dattwyler et al. 1986). Wie zu erwarten konnte auch in unserer Studie kein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Lymphoproliferation auf TT von Lyme-Patienten im Vergleich zu Kontrollen beobachtet werden. Daher ist TT gut als ein Kontroll-Antigen geeignet.

5.2.5 Charakterisierung der zellulären Immunreaktion im Verlauf der Infektion - Einfluß der antibiotischen Therapie auf die zelluläre Immunantwort

Während der frühe Beginn einer antibiotischen Therapie offensichtlich die Entwicklung der humoralen Immunantwort beeinflussen kann (Abbildung 3c), scheint die zelluläre Immunantwort auf Borrelia-Antigene weitgehend intakt und unbeeinflusst zu bleiben (Dressler et al. 1991). Dies bestätigte sich auch in der vorliegenden Studie an 10 Kindern mit Lyme-Borreliose, die 1 bis 6 Monate nach erfolgter Therapie erneut auf zelluläre Reaktivität untersucht wurden (Abbildung 12 a-c, S. 62). Obwohl es bei

einigen Patienten zum Verlust der Borrelien-AK kam, konnte in allen Fällen beobachtet werden, daß sich die Proliferationsraten vor und nach antibiotischer Therapie weder auf Lysat-Antigene von *B. burgdorferi*, noch auf die rekombinanten Antigene OspC, Osp17, p39 und p41 (signifikant) unterschieden. Dies spricht dafür, daß auch eine frühzeitige Antibiotika-Therapie, im Gegensatz zur humoralen Immunantwort, die zelluläre Immunantwort weniger zu beeinflussen scheint.

5.3 Zytokin-Sekretion von *B. burgdorferi*-spezifischen T-Zellen

Um die zelluläre Immunreaktion bei der akuten Infektion mit *B. burgdorferi* funktionell näher zu charakterisieren, wurde das Zytokinmuster der *B. burgdorferi*-stimulierten Zellen analysiert. Untersucht wurde die Sekretion von IFN- γ - als klassischem Vertreter einer Th1-Antwort -, sowie IL-10 und IL-4, als Vertreter einer Th2-Antwort. Aus früheren Studien ist bekannt, daß bei einer chronischen *B. burgdorferi*-Infektion eine Th1-Immunantwort dominiert (s.u.).

5.3.1 Die Rolle der IFN- γ Sekretion

IFN- γ ist ein Zytokin, da ß im Rahmen einer proinflammatorischen Immunantwort sezerniert wird. Zu den Wirmechanismen gehören beispielsweise die Regulation einer antiviralen Immunantwort und Immunität gegenüber intrazellulären Erregern (Trinchieri 2001). Bei Infektionen mit obligatorisch oder fakultativ intrazellulären Erregern scheint die Ausbildung einer Th1-Antwort wesentlich für die Überwindung der Infektion zu sein (Burmester et al. 1995). Eine deutliche IFN- γ Sekretion kann regelmäßig bei Patienten mit chronischer Lyme-Borreliose nachgewiesen werden und auch in nicht infizierten Individuen konnten Th1-Phänotyp-Muster durch *Borrelia* Antigene induziert werden (Infante-Duarte und Kamradt 1997). IFN- γ spielt somit eine zentrale Rolle bei der Abwehr der Erkrankung, also bei der Elimination der Borrelien und Überwindung der Infektion. Eine überschießende IFN- γ Sekretion war jedoch im Mausmodell mit einer hyperinflammatorischen Reaktion assoziiert, d.h. mit dem Ausmaß der Gewebsdestruktion. Bei Infektionen mit *B. burgdorferi* birgt eine starke Th1-Zytokin Reaktion jedoch das Risiko, daß sich eine Arthritis entwickelt, wie im Mausmodell (Keane-Myers et al. 1996, Matynak et al. 1995, Rao und Frey 1995) und bei Menschen (Yin et al. 1997, Yssel et al. 1991) gezeigt werden konnte. Da IFN- γ ein pro-inflammatorisches Zytokin ist, könnte die hohe IFN- γ Produktion *Borrelia*-

spezifischer Zellen zur Erklärung beitragen, warum bei der Lyme-Borreliose regelmäßig eine entzündliche Reaktion auftritt, die nicht im Verhältnis zur geringen Erregerzahl steht. Ekerfelt et al. beispielsweise mutmaßen, daß hohe Konzentrationen von IFN- γ in Abwesenheit von IL-4 (s.u.) für Gewebsdestruktion bei Neuroborreliose mitverantwortlich sein könnte (Ekerfelt et al. 1997).

In unserer Studie wurden 23 Kulturen von 18 pädiatrischen Patienten mit akuter Lyme-Borreliose auf Sekretion von IFN- γ untersucht. Insgesamt wurde auf Stimulation mit allen hier verwendeten Borrelia-Antigenen eine deutliche IFN- γ Produktion detektiert. Allerdings führte die Stimulation mit Borrelia-Lysaten zu einer signifikant höheren und häufigeren IFN- γ Sekretion (77% bei *B. garinii*- und 83% bei *B. afzelii*-Stimulation, $p=0,001$ für beide Lysate), als die Stimulation mit OspC (48%). Dies ist am wahrscheinlichsten durch die Tatsache erklärt, daß die Lysat-Antigene eine Vielzahl von Borrelien-Proteinen enthalten, während OspC als rekombinantes Antigen nur ein einzelnes Protein darstellt. Jedoch wurde auch auf Tetanustoxoid im Vergleich zu OspC eine deutlich höhere IFN- γ Ausschüttung beobachtet. Möglicherweise stellt Tetanustoxoid als recall-Antigen einen potenteren T-Zell-Stimulus dar, als rekombinantes OspC.

Wir konnten mit unserer Studie zeigen, daß schon in frühen Stadien der Infektion mit *B. burgdorferi* auch bei pädiatrischen Patienten eine deutliche Th1-Immunantwort vorherrscht. Bisher war dieses Phänomen nur bei erwachsenen Patienten mit hauptsächlich Manifestationen der Lyme-Borreliose im Stadium III beobachtet worden (Forsberg et al. 1995, Pohl-Koppe et al. 1998, Glickstein et al. 2003).

5.3.2 IL-10 Sekretion

IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, das von Monozyten und Th2 Helferzellen produziert wird. Es ruft antiinflammatorische Effekte hervor durch Beeinflussung von Phagozyten und Antigen-präsentierenden Zellen, bei denen IL-10 die Sekretion proinflammatorischer Zytokine hemmt (Report of WHO Scientific Group 1997, Trinchieri 2001). IL-10 beeinträchtigt sehr stark die bakterizide Aktivität von Phagozyten und läßt somit die intrazelluläre Persistenz von Erregern zu (z.B. *Mycobacterium tuberculosis*, Redpath et al. 2001; *Leishmania major*, Kane und Moser 2001, Trinchieri 2001). Giambartolomei et al. (1998) konnten beobachten, daß durch Borrelia-Antigene auch bei PBMC von gesunden Individuen eine IL-10 Produktion

provoziert werden konnte. Da durch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 im Mausmodell zwar die Entzündungsreaktion und somit auch die Gewebsdestruktion gemildert, jedoch auch die Elimination des Erregers unterdrückt wurde (Ganapamo et al. 2003), ist anzunehmen, daß IL-10 eine wesentliche Rolle bei der Etablierung einer chronischen Lyme-Borreliose spielt. Ob eine deutliche IL-10 Sekretion auch bei der akuten Infektion mit *B. burgdorferi* zu beobachten ist, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden:

Es wurden 23 Blutproben von 18 pädiatrischen Patienten mit akuter Lyme-Borreliose in unserer Studie untersucht. Bezüglich der IL-10 Sekretion konnten deutliche Unterschiede zwischen *Borrelia*-spezifischen und TT-spezifischen Zellen beobachtet werden. Insgesamt war die IL-10 Produktion deutlich niedriger, als die IFN- γ Produktion, was für eine erwartungsgemäße Dominanz der Th1 Antwort spricht.

Eine relevante IL-10 Konzentration konnte jedoch in 59% (10/17) der *B. garinii*-, in 39% (9/23) der *B. afzelii*- und in 32% (7/22) der OspC-Stimulationen gemessen werden. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Ausprägung der IL-10 Sekretion bei *Borrelia*-stimulierten PBMC von Patienten mit verschiedenen klinischen Manifestationen beobachten. Tendenziell konnte jedoch eine seltenere IL-10 Sekretion bei Patienten mit Lyme-Arthritis beobachtet werden. Da jedoch die Zahl der LA Patienten sehr klein war, lassen sich keine statistisch signifikanten Aussagen treffen. Im Vergleich zu der IL-10 Sekretion auf *Borrelia*-Stimulation konnte nur in einer einzigen von 23 Stimulationen mit Tetanustoxoid eine relevante IL-10 Sekretion beobachtet werden.

Zusammenfassend ist die Th2-Immunantwort bezüglich IL-10 bei der akuten Lyme-Borreliose geringer ausgeprägt als die Th1-Antwort.

5.3.3 IL-12 induziert gleichzeitige IL-10 und IFN- γ Sekretion *B. burgdorferi*-spezifischer Zellen

Eine herausragende Rolle bei der Differenzierung in Th1- bzw. Th2-Antwort in der frühen Infektionsphase spielt IL-12. In vitro konnte beobachtet werden, daß das Zytokin-Sekretionsmuster nach exogener Zugabe von IL-12 in den ersten Tagen der Kultivierung insofern beeinflusst werden konnte, daß Th1-differenzierte T-Zellen in der Lage waren, sowohl IFN- γ , als auch IL-10 zu produzieren. Diese Zellen scheinen wesentlich bei der Etablierung einer chronischen Infektion zu sein (Pohl-Koppe et al.

1998, Gerosa et al. 1996). Da *B. burgdorferi* auch Th2-Zytokine induzieren kann (IL-6 (Sigal 1997, Yang et al. 1992), IL-13 (Glickstein et al. 2003), IL-10 (Pohl-Koppe et al. 1998)) läßt sich vermuten, daß der tatsächliche Effekt, also die Ausprägung der Manifestation, aber auch die Überwindung der Infektion durch die "Netto-Auswirkung" der Zytokinmuster bedingt zu sein scheint. Gross et al. beschreiben dies als Th1:Th2 Ratio (Gross et al. 1998) und vermuten darin einen zentralen Mechanismus bei den unterschiedlichen (asymptomatisch bis chronisch/Therapieresistent) Verläufen einer *B. burgdorferi*-Infektion.

Ob dieses Phänomen auch bei der akuten *B. burgdorferi*-Infektion zu beobachten ist, war Gegenstand der vorliegenden Arbeit:

Zunächst wurde bei der Untersuchung der Zytokinsekretion die Beobachtung gemacht, daß eine deutliche Proliferation nicht immer mit einer hohen Produktion von Zytokin einher ging (Abbildung 16). Dies läßt darauf schließen, daß die Zellen auf die verschiedenen Antigen-Stimuli unterschiedlich empfänglich für Zytokin-Induktion gewesen sein könnten, bzw. *Borrelia*-spezifische Zellen unterschiedlich ausgeprägte Zytokinmerkmale besitzen können. Ob andererseits die Zytokin-Sekretion die Proliferation beeinflusst haben könnte, ist mit den hier angewandten Methoden nicht überprüft worden.

Es wurde bereits von anderen Autoren beobachtet, daß die Anwesenheit hoher Konzentrationen von IFN- γ die IL-10 Sekretion hemmt (Gerosa et al. 1999). Diese Beobachtung einer hohen IFN- γ Sekretion mit negativem oder nur geringem IL-10-Nachweis wurde bei den meisten unserer Patienten gemacht. Bei einigen Patienten konnte jedoch in Anwesenheit hoher IFN- γ Mengen eine signifikante IL-10 Sekretion beobachtet werden. Eine eindeutige Gemeinsamkeit unter diesen Patienten ließ sich jedoch nicht feststellen.

Da sich bei der Proliferationsaktivität und dem Ausmaß der Zytokinsekretion kein direkt proportionaler Zusammenhang erkennen ließ, wurde ein Sekretionsindex errechnet.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, daß IL-12 nicht nur die Sekretion von IFN- γ , sondern auch von IL-10 erhöht. Um die Rolle von IL-10 näher zu beleuchten, untersuchten wir die Zytokinsekretion von IL-10 mit und ohne exogene IL-12 Stimulation bzw. mit anti-IL-12-AK. Bei der Betrachtung der Zytokinsekretion in Relation zur Proliferation stellte sich heraus, daß in Anwesenheit von IL-12 in den Stimulationen mit *B. burgdorferi*-Lysat sowie in geringerem Maße mit OspC

gleichzeitig eine deutliche IL-10- und IFN- γ -Sekretion zu beobachten war.

Vergleichbar hohe Sekretions-Indizes für beide Zytokine gleichzeitig wurden weder in den Konditionen ohne exogene IL-12 Zufuhr, noch in den Konditionen mit anti-IL-12 oder unter Stimulation mit TT gemacht. Eine vollständige Unterdrückung von IL-10 unter anti-IL-12-AK Zufuhr konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Desweiteren war festzustellen, daß die Sekretions-Indizes von IL-10 in den Kulturen mit exogen zugefügtem IL-12 höher waren, als in den Konditionen ohne exogene IL-12 Zugabe und in den Konditionen mit anti-IL-12-AK. Daher läßt sich vermuten, daß die IL-10 Sekretion (Th2!) durch IL-12 (Th1!) bei Borrelia-stimulierten T-Zellen gefördert wird. Dieses Phänomen wurde bereits von Gerosa et al. 1996 beschrieben.

In weiteren Studien wurde ebenfalls die Beobachtung gemacht, daß IL-12 gleichzeitig die Sekretion von IFN- γ und IL-10 induzieren kann (Pohl-Kopp et al. 1998, Gerosa et al. 1996, Windhagen et al. 1996). Es läßt sich also postulieren, daß eine gegenseitige Modulation der pro- und antiinflammatorischen Immunantwort stattfindet.

Aufgrund dieser Publikationen und unserer Beobachtungen könnte man daher postulieren, daß die frühe systemische Borrelieninfektion zu einer deutlichen IFN- γ -Sekretion führt, die zur Elimination der Borrelien wichtig ist, jedoch nur ausnahmsweise auch eine signifikante IL-10-Sekretion bedingt. Diese würde möglicherweise ohne antibiotische Therapie den Weg zu einer chronischen Borrelieninfektion bahnen. Ob in unseren Fällen der gleichzeitigen bzw. hohen IL-10 Sekretion die Eliminierung der Borrelien im "natürlichen Krankheitsverlauf" verhindert worden wäre und ob es bei diesen Kindern ohne ausreichende antibiotische Therapie zur Etablierung einer chronischen Lyme-Borreliose gekommen wäre, wäre daher denkbar.

Insgesamt unterstützen unsere Ergebnisse die bisher in der Literatur beschriebenen Beobachtungen und unsere Studie trägt dazu bei, die zentrale, kritische Rolle von IL-10 in der Modulation der Immunreaktion bei einer Infektion mit *B. burgdorferi* und Etablierung einer chronischen Lyme-Borreliose zu bestätigen.

5.3.4 IL-4 Sekretion

Die Untersuchung der Rolle von IL-4, einem anti-inflammatorischen Zytokin, daß die Th2-Differenzierung vermittelt, hat bisher folgende Ergebnisse erbracht:

Durch eine IL-4 vermittelte Th2-Antwort wird die Elimination des Erregers verhindert.

IL-4 verringert die IL-12-vermittelte IFN- γ Sekretion und unterdrückt die IL-10 Sekretion fast gänzlich. Umgekehrt wird in Abwesenheit von IL-4 mehr IFN- γ produziert, bzw. in Abwesenheit von IFN- γ die IL-4 Sekretion unterdrückt. Ekerfelt et al. vermuten, daß hohe Konzentrationen von IFN- γ in Abwesenheit von IL-4 (s.u.) für Gewebsdestruktion bei Neuroborreliose mitverantwortlich sein könnte (Ekerfelt et al. 1997). Insgesamt scheint IL-4, bzw. eine Th2-Antwort bezüglich der Ausprägung der Gewebsdestruktion einen protektiven Effekt zu haben, die Elimination der Erreger wird jedoch durch eine Th2-dominierte Immunantwort unterdrückt.

In unserer Studie konnte in den Zellkulturen weder auf Stimulation mit Borrelialysat-Antigenen, noch mit rekombinantem OspC eine relevante IL-4 Sekretion beobachtet werden. Ebenso wenig ließ sich IL-4 in den Zellkulturen nachweisen, die mit Tetanustoxoid stimuliert wurden. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von anderen Autoren gemacht. Somit bestätigen die Ergebnisse unserer Untersuchungen, die bei pädiatrischen Patienten durchgeführt wurden, das bisherige Bild einer Th1-dominierten Immunantwort bei der akuten Lyme-Borreliose.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse unserer Studie, die im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen bei Patienten mit chronischer LB, in der gleichzeitig eine IFN- γ und hohe IL-10-Sekretion beobachtet wurde, daß bei Kindern mit akuter LB eine deutliche Dominanz der Th-1-vermittelten Immunantwort vorliegt.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Immunantwort bei Kindern mit akuter Lyme-Borreliose näher charakterisiert werden. Insbesondere sollte die humorale und zelluläre Immunreaktion auf *B. burgdorferi* sowie die Zytokinsekretion Borrelia-reaktiver Lymphozyten beobachtet werden:

Serologische Ergebnisse: 89,8% (44/49) der pädiatrischen Patienten mit früher Lyme-Borreliose bildeten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nachweisbare Serum-Antikörper. In Abhängigkeit von Inkubationszeit und Dauer der Symptome wurden zunächst IgM-AK, später (IgM- und) IgG-AK gebildet. Kinder ohne zeitnah aufgetretenes EM bildeten signifikant höhere IgG-Titer, als Kinder mit EM. Bei bereits nachweisbarer IgG-AK-Bildung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wurden signifikant höhere IgM-Titer gemessen, als bei fehlender IgG-AK-Bildung (Tabellen 4 und 5). Bemerkenswert war die Beobachtung, daß bei allen Kindern (n = 11) mit positiven IgM-Titern ohne IgG-AK zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nach erfolgter antibiotischer Therapie keine IgG-Serokonversion stattfand (Abbildung 3c). Bei diesen Kindern war die Symptombdauer bzw. Inkubationszeit bis zum Beginn der antibiotischen Therapie im Vergleich zu den Kindern mit initial positiven IgG-AK-Titern kürzer. Daraus könnte man schließen, daß eine frühe antibiotische Therapie eine IgG-AK-Bildung unterbinden kann. War bei Diagnosestellung eine deutliche humorale Immunantwort bereits etabliert, blieb diese trotz antibiotischer Therapie über viele Monate bestehen (Abbildungen 3a,b).

Lymphozytenstimulationen: 63,2% (*B. garinii*) bzw. 70,0% (*B. afzelii*) der Kinder mit akuter Lyme-Borreliose zeigten unabhängig vom Antikörperstatus im Vergleich zu altersgleichen Kontrollpatienten eine signifikant erhöhte Lymphozytenproliferation ($\Delta\text{cpm} > 10.000$) gegen über *B. burgdorferi* Lysat-Antigenen (Abbildungen 7 a-d). Das führende immunodominante Antigen bei der frühen Infektion mit *B. burgdorferi* war OspC: 35,1% der Patienten wiesen anti-OspC-AK im Serum auf, eine relevante zelluläre Immunantwort auf OspC war sogar bei 89,2% der pädiatrischen Patienten nachweisbar. Ein weiteres immunodominantes Protein war p41: Eine Antikörperbildung gegen p41 lies sich bei 51,4%, eine zelluläre Immunantwort bei 50% (4/8 Kindern) nachweisen.

Eine geringere Rolle in der frühen Infektionsphase spielten die Proteine Osp17 und p39. Nur 21,2% der Kinder mit akuter Lyme-Borreliose bildeten Osp17-spezifische AK und nur 16,3% zeigten eine Osp17-spezifische Lymphoproliferation. Ebenso wenig prominent war die Immunantwort auf p39 mit 28,6% Antikörperbildung und 18,8% zellulärer Immunreaktion. Bei allen 4 untersuchten rekombinanten Proteinen konnte beobachtet werden, daß sich die humorale und zelluläre Immunantwort unabhängig von einander etablierten. Das Muster der humoralen und zellulären Immunantwort bei den pädiatrischen Patienten unserer Studie entspricht insgesamt den früheren Beobachtungen aus Tiermodellen und serologischen Studien bei erwachsenen Patienten, in denen gezeigt werden konnte, daß OspC vor allem in der frühen Infektionsphase von *B. burgdorferi* und Osp17 bzw. p39 vorwiegend in späteren Phasen der Infektion exprimiert wird, jedoch das Flagellum-Antigen p41 zu jedem Zeitpunkt der Infektion nachweisbar ist. Anhand von Verlaufsbeobachtungen konnte demonstriert werden, daß im Gegensatz zur humoralen Immunantwort die zelluläre Reaktivität von einer frühen Antibiotika-Therapie unbeeinflusst blieb.

Zytokinsekretion: Zur funktionellen Charakterisierung der zellulären Reaktivität auf eine *B. burgdorferi*-Infektion wurde die Zytokinsekretion von IFN- γ als Vertreter einer Th1-Immunantwort – sowie von IL-10 und IL-4 – als Vertreter einer Th2-Immunantwort – auf Stimulation mit *Borrelia*-Antigenen analysiert:

IFN- γ : In Zellkulturen von Lyme-Patienten konnte sowohl auf Stimulation mit *Borrelia*-Antigenen, als auch auf Tetanustoxoid durchschnittlich mehr IFN- γ gemessen werden, als in Kulturen von Kontrollpatienten, wobei die IFN- γ -Sekretion auf Stimulation mit Lysat-Antigenen sowie Tetanustoxoid signifikant höher war als auf OspC. Das Ausmaß der IFN- γ -Sekretion war unabhängig von der Manifestation und Stadium der LB. Ein proportionaler Zusammenhang von Proliferationsaktivität und Zytokinsekretion ließ sich nicht beobachten; ebenso wenig schien eine antibiotische Therapie das Sekretionsverhalten zu beeinflussen (Tabelle 13, Abbildung 13).

IL-10: Im Vergleich zur IFN- γ -Sekretion war die IL-10-Sekretion in den Stimulationen mit *Borrelia*-Antigenen geringer ausgeprägt. Zellkulturen von Lyme-Patienten sezernierten im Durchschnitt mindestens 10fach höhere Mengen auf Stimulation mit *Borrelia*-Antigenen, als Kontrollen. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied in der

Ausprägung der IL-10-Sekretion zwischen Lysat-Antigenen und OspC detektieren. TT induzierte keine relevante IL-10 Sekretion in Kulturen von Patienten und Kontrollen (Tabelle 14, Abbildung 14). Die IL-10 Sekretion vor bzw. nach Antibiotikatherapie unterschied sich nicht im Vergleich von IFN- γ und IL-10-Sekretion ließ sich kein Zusammenhang beobachten.

IL-4: Eine relevante IL-4-Sekretion wurde weder in Stimulationen mit Borrelia-Antigenen oder Tetanustoxoid (Abbildung 15), noch unter Co-Stimulation mit IL-12 (s.u.) gemessen

Co-Stimulation mit IL-12: Durch exogene Zufuhr von IL-12 ließ sich die IFN- γ -Sekretion in den Stimulationen mit Borrelia-Antigenen und Tetanustoxoid signifikant steigern (Abbildung 16). Die Zell-Proliferationen wurden von IL-12 scheinbar nicht beeinflusst. Das Ausmaß der IL-10-Sekretion blieb in allen Stimulationen mit exogener IL-12-Zufuhr unverändert. Es ließen sich jedoch einzelne Kulturen von Patienten mit Lyme-Borreliose unterschiedlicher Manifestationen beobachten, bei denen unter Co-Stimulation mit IL-12 eine gleichzeitige, relevante Sekretion von IL-10 und IFN- γ gemessen werden konnte, und zwar nur in Stimulationen mit Borrelia-Lysat oder OspC, nicht jedoch mit Tetanustoxoid.

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß bei Kindern mit akuten systemischen Manifestationen der LB eine deutliche humorale Immunantwort vorliegt, die in erster Linie durch eine IgM-AK-Bildung gekennzeichnet ist, während eine IgG-Serokonversion und somit eine dauerhafte humorale Immunität bei kurzer Symptombdauer bzw. frühzeitiger Antibiotikatherapie ausbleiben kann.

Desweiteren konnte eine deutliche zelluläre Immunreaktion gegen die Borrelia-Antigene OspC und p41, nicht jedoch gegen Osp17 und p39 demonstriert werden. Borrelia-reaktive Zellen sind durch eine starke IFN- γ -Sekretion charakterisiert.

7 Literatur

Aberer E, Brunner C, Suchanek G, Klade H, Barbour A, Stanek G, Lassmann H (1989) Molekular mimikry and Lyme borreliosis: A shared antigenic determinant between *Borrelia burgdorferi* and human tissue. *Ann Neurol* 26:732-737

Afzelius A (1910) Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm am 28. Oktober 1909. *Arch Dermatol Syph* 101:404

Aguero-Rosenfeld ME, Nowakowski J, Bittker S, Cooper D, Nadelmann RB, Wormser GP (1996) Evolution of the serologic response to *Borrelia burgdorferi* in treated patients with culture-confirmed erythema migrans. *J Clin Microbiol* 34:1-9

Akin E, McHugh GL, Flavell RA, Fikrig E, Steere AC (1999) The immunoglobulin (IgG) antibody response to OspA and OspB correlates with severe and prolonged Lyme-Arthritis and the IgG response to P35 correlates with mild and brief arthritis. *Infect Immun* 67:173-181

Albrecht S, Hofstaedter S, Artsob H, Chaban O, From L (1991) Lymphadenosis benigna cutis resulting from *Borrelia* infection (*Borrelia lymphocytoma*). *J Am Acad Dermatol* 24:621-625

Anguita J, Pershing DH, Rincon M, Barthold SW, Fikrig E (1996) Effect of anti-interleukin 12 treatment on murine Lyme borreliosis

Asbrink E, Hovmark A, Olsson I (1989) Lymphadenosis benigna cutis solitaria - *Borrelia lymphocytoma* in Sweden. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A Supl.* 18:156-163

Atlas E, Novak SN, Duray PH, Steere AC (1988) Lyme myositis: muscleinvasion by *Borrelia burgdorferi*. *Ann Intern Med* 109:245-246

Bärfverstedt B (1943) über Lymphadenosis benigna cutis. *Acta Dermatol Venerol Supl.* 24:1-202

Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin I, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PA (1992) Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. Nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* 42:378-383

Barbour AG (1984) Isolation and cultivation of Lyme disease species. *Yale J Biol Med* 57:521-525

Barbour AG, Hayes SF (1986a) Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* 50:381-400

Barbour AG, Hayes SF, Heiland RA, Schrupf ME, Tessier SL (1986b) A *Borrelia*-specific monoclonal antibody binds to a flagellar epitope. *Infect Immun* 52:549-554

Barthold SW, Sidman CL, Smith AL (1992) Lyme borreliosis in genetically resistant and susceptible mice with severe combined immunodeficiency. *Am J Trop Med Hyg* 47:605-613

Barthold SW, De Souza MS, Jatanka JL, Smith AL, Pershing DH (1993) Chronic

Lyme borreliosis in the laboratory mouse. *Am J Pathol* 143:959-971

Barthold SW, Bockenstedt LK (1993) Passive immunizing activity of sera from mice infected with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 61:4696-4702

Barthold SW, De Souza MS (1995) Exacerbation of Lyme-Arthritis in beige mice. *J Infect Dis* 172:778-784

Barthold SW, de Souza MS, Feng S (1996) Serum-mediated resolution of Lyme arthritis in mice. *Lab invest* 74:57-67

Bentas W, Karch H, Huppertz HI (2000) Lyme-Arthritis in children and adolescents: outcome 12 months after initiation of antibiotic therapy. *J. Rheumatol* 27:2025-2030

Berger BW (1993) Laboratory tests for Lyme disease. *Dermatol Clin* 12 (1):19-24

Berglund J, Eitrem R, Ornstein K et al. (1995) An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden. *N Engl J Med* 333:1319-1327

Buchwald A (1883) Ein Fall von diffuser idiopathischer Hautatrophie. *Arch Dermatol Syph* 10:553-556

Bunikis J, Luke CJ, Bunikiene E, Bergström S, Barbour AG (1998) A surface-exposed region of a novel outer membrane protein (p66) of *Borrelia* spp. is variable in size and sequence. *J. Bacteriol* 180:1618-1623

Bunikis J, Barbour AG (1999) Access of antibody or trypsin to an integral outer membrane protein (p66) of *Borrelia burgdorferi* is hindered by Osp lipoproteins. *Infect Immun* 67:2874-2883

Burckhardt JL (1911) Zur Frage der Follikel- und Keimzentrenbildung in der Haut. *Frankf Z Pathol* 6:352-359

Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP (1982) Lyme disease - a tick borne spirochetosis? *Science* 216:1317-1319

Burmester GR, Kamradt T, Krause A (2002) Lyme disease (Lyme borreliosis). In: Maddison PJ et al. (eds) *Oxford Textbook of Rheumatology* (in press)

Canica MM, Nato F, Du Merle L, Nazie JC, Baranton G, Postic D (1993) Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. Nov. Associated with late manifestations of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis* 25:441-448

Christen HJ, Hanefeld F, Eiffert H, Thomssen R (1993) Epidemiology and clinical manifestations of Lyme borreliosis in childhood. A prospective multicenter study with special regard to neuroborreliosis. *Acta Paediatr Suppl* 386:S1-S76

Coleman JL, Rogers RC, Benach JL (1992) Selection of an escape variant of *Borrelia burgdorferi* by use of bactericidal monoclonal antibodies to OspB. *Infect Immun* 60:3098-3104

Craft JE, Duncan K, Fisher DK, Shimamoto GT, Steere AC (1986) Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease: appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G response late in the illness. *J Clin Invest* 78:934-939

Dattwyler RJ, Halperin JJ, Volkman DJ, Luft BJ (1988a) Treatment of late Lyme borreliosis – randomized comparison of ceftriaxone and penicillin. *Lancet* 1:1191-1194

Dattwyler RJ, Volkman DJ, Luft BJ, Halperin JJ, Golightly MG (1988b) Seronegative Lyme disease. *N Engl J Med* 319:1441-1446

Dattwyler RJ, Thomas JA, Benach JL, Golightly MG, (1988) Cellular immune response in Lyme disease: the response to mitogenes, live *Borrelia burgdorferi*, NK cell function and lymphocyte subsets. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 263:151-159

Dattwyler RJ, Luft BJ, Kunkel MJ et al.(1997) Ceftriaxone compared with doxycycline for the treatment of acute disseminated Lyme disease. *N Engl J Med* 337:289-294

De Silva AM, Fikrig E (1997) Arthropod- and host-specific gene expression by *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Invest* 99:377-379

Dressler F, Yoshinari NH, Steere AC (1991) The T cell proliferative assay in the diagnosis of Lyme disease. *Ann Intern Med* 115:533-539

Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC (1993) Westernblotting in the serodiagnosis of Lyme disease 167:392-400

Ebnet K, Simon MM, Shaw S (1996) Regulation of chemokine expression in human endothelial cells by proinflammatory cytokines and *Borrelia burgdorferi*. *Ann NY Acad Sci* 797:107-117

Eppes SC, Klein JD, Caputo G, et al. Physician beliefs, attitudes and approaches toward Lyme disease in an epidemic area. *Clin Pediatr* 1994; 33:130-134

Eppes SC (2003) Diagnosis, Treatment, and Prevention of Lyme Disease in Children. *Pediatr Drugs* 5 (6):363-372

Franz JK, Krause A (2003) Lyme disease (Lyme borreliosis). *Best Pract Res Clin Rheumatol*

Fikrig E, Barthold SW, Kantor FS, Flavell RA (1990) Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. *Science* 250:553-555

Fikrig E, Telford SR, Barthold SW, Kantor FS, Spielman A, Flavell RA (1992) Elimination of *Borrelia burgdorferi* from vector ticks by on OspA-immunized mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5418-5421

Fikrig E, Berland R, Chen M, Williams S, Sigal LH, Flavell RA (1993) Serologic response to the *Borrelia burgdorferi* flagellin demonstrates an epitope common to a neuroblastoma cell line. *Proc Natl Acad Sci* 90:183-187

Fikrig E, Barthold SW, Chen M, Grewal IS, Craft J, Flavel RA (1996) Protective antibodies in murine Lyme disease arise independently of CD40 ligand. *J Immunol* 157:1-3

Fingerle V, Hauser U, Liegl G, Petko B, Preac-Mursic V, Wilske B (1995) Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *J Clin Microbiol* 33:1867-1869

Fingerle V, Liegl G, Munderloh U, Wilske B (1998) Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks removed from humans. *Med Microbiol Immunol* 187:121-126

Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, Whitze O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbusch J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MI, Cicayne J, Venter JC (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390:580-586

Fung BP, McHugh GL, Leong JM, Steere AC (1994) Humoral immune responses to outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease: role of the immunoglobulin M response in the serodiagnosis of early infection. *Infect Immun* 62:3213-3221

Garcia-Monco JC, Wheeler CM, Benach JL, Furie MB, Lukehart SA, Stanek G, Steere AC (1993) Reactivity of neuroborreliosis patients (Lyme disease) to cardiolipin and gangliosides. *J Neurol Sci* 117:206-214

Garcia-Monco JC, Seidman RJ, Benach JL (1995) Experimental immunization with *Borrelia burgdorferi* induces development of antibodies to gangliosides. *Infect Immun* 63:4130-4137

Gautier C, Vignolly B, Taib A (1995) Benign cutaneous lymphocytoma of the breast areola and erythema chronicum migrans: an association pathognomonic of Lyme disease. *Arch Pediatr* 2:343-346

Gerber MA, Shapiro ED, Burg GS, Parcels VJ, Bell GL (1996) Lyme disease in children in southeastern Connecticut. *N Engl J Med* 335:1270-1274

Germann T, Gately MK, Schoenhaut DS, Lohoff M, Mattner F, Fischer S, Jin S, Schmitt E, Rude E (1993) Interleukin-12/T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th 1) but not on Th2 cells. *Eur J Immunol* 23:1762-1770

Gerosa F, Paganin C, Peritt D, Paiola F, Scupoli MT, Asteamezaga M, Frank I, Trinchieri G (1996) Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *J Exp Med* 183:2559-2569

Giambartolomei GH, Dennis VA, Phikipp MT (1998) *Borrelia burgdorferi* stimulates the production of interleukin-10 in peripheral blood mononuclear cells from uninfected humans and rhesus monkeys. *Infect Immun* 66:2691-2697

Gilmore RD, Kappel KJ, Dolan MC, Burkot TR, Johnson BJ (1996) Outer surface protein C, but not p39, is a protective immunogen against tick-transmitted *Borrelia burgdorferi* challenge: evidence for a conformational protective epitope in OspC. *Infect Immun* 64:2234-2239

Godfroid E, Ben Messaoud A, Poliszczak A, Lobet Y, Bollen A (1995) Assignment of *Borrelia burgdorferi* strains G25 and VS 461 to the *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* genospecies, respectively: a comparison of OspA protein sequence. *DNA seq* 5:251-254

Gross DM, Steere AC, Huber BT (1998) T Helper 1 Response Is Dominant and Localized to the Synovial Fluid in Patients with Lyme Arthritis. *J Immunol* 160:1022-1028

Gross DM, Huber BT (2000) Cellular and molecular aspects of Lyme Arthritis. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1562-69

Guerau-de-Arellano M, Huber BT (2002) Development of autoimmunity in Lyme arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 14:388-393

Hahn H, Falke D, Klein P (1991) *Medizinische Mikrobiologie*, Springer Verlag, S. 472

Hansen K, J.M. B, Fjordvang H, Pedersen NS, Hindersson P (1988) Immunochemical characterization and isolation of the gene for a *Borrelia burgdorferi* immunodominant 60k da antigen common to a wide range of bacteria. *Infect Immun* 56:2047-2053

Hansen K, Cruz M, Link H (1990) Oligoklonal *Borrelia burgdorferi*-specific IgG-antibodies in cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis. *J Infect Dis* 161:1194-1202

Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R, Wilske B, (1997) Interpretation criteria for standardized western blots for three european species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *J Clin Microbiol* 35:1433-1444

Herxheimer K, Hartmann K (1902) Über Acrodermatitis chronica atrophicans. *Arch Dermatol Syph* 61:57-76

Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R, Welsche H, Weis HJ, Wooten RM, Weiss JJ (1999) Inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J Immunol* 163:2382-2386

Hu LT, Klempner MS (2001) Update on the prevention, diagnosis, and treatment of Lyme disease. *Adv Intern Med* 46:247-75

Huppertz HI, Karch H, Suschke HJ, Döring E, Ganser G, Thon A, Bentas W, Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Rheumatologie (1995) Lyme-Arthritis in european children and adolescents. *Arthritis Rheum* 38:361-368

Huppertz HI, Böhme M, Standaert, Karch H, Plotkin SA (1999) Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18:697-703

Huppertz HI (2001a) Lyme disease in children. *Curr Opin Rheumatol* 13:434-439

Huppertz HI, Dressler F (2001b) In: Cassidy JT, Petty RE (eds) Textbook of pediatric rheumatology. Saunders, Philadelphia

Huppertz HI, Krause A (2003) Lyme-Borreliose. Internist 2003 44:175-183

Jauris-Heipke S, Rossle B, Wanner G, et al. (1997) Lipopeptides of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins induce Th1 phenotype development in $\alpha\beta$ T cell receptor transgenic mice. Infect Immun 65:4094-4099

Kaiser R (1998a) Neuroborreliosis J Neurol 245:247-255

Kalish RA, Leong JM, Steere AC (1993) Association of treatment-resistant chronic Lyme-Arthritis with HLA-DR4 and antibody reactivity to Osp A and Osp B. Infect Immun 61:2774-2779

Kalish RA, Kaplan RF, Taylor E, Jones-Woodward L, Workman K, Steere AC (2001). Evaluation of study patients with Lyme disease, 10-20-year follow-up. J Inf Dis 183:453-460

Kamogawa Y, Minasi LE, Carding SR, Bottomly K, Flavell RA (1993) The relationship of IL-4 and IFN gamma producing T cells studied by lineage ablation of IL-4 – producing cells. Cell 75:985-995

Kamradt T, Lengel-Janßen B, Strauss A, Bansal G, Steere AC (1996) Dominant recognition of a *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A peptide by T helper cells in patients with treatment-resistant Lyme-Arthritis. Infect Immun 64:1284-1289

Karkkonen K, Stiernstedt SH, Karlsson M. (2001) Follow-up of patients treated with oral doxycycline for Lyme neuroborreliosis. Scand J Inf Dis 33:259-262

Keane-Myers A, Nickell SP (1995a) T-cell subset-dependent modulation of immunity to *Borrelia burgdorferi* in mice. J Immunol 154:1770-1776

Keane-Myers A, Nickell SP (1995b) Role of IL-4 and IFN-gamma in modulation of immunity to *Borrelia burgdorferi* in mice. J Immunol 155:2020-2028

Keane-Myers A, Maliszewski CR, Finkelmann FD, Nickell SP (1996) Recombinant IL-4 treatment augments resistance to *Borrelia burgdorferi* infections in both normal susceptible and antibody deficient mice. J Immunol 156:2488-2494

Klempner MS et al. (2001) Two controlled trials of antibiotic treatment in patients with persistent symptoms and a history of Lyme disease. N Engl J Med 345:85-92

Lam TT, Nguyen T-P, Montgomery RR, Kantor FS, Kikrig E, Flavell RA (1994) Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. Infect Immun 62:290-298

Lardieri G, Salvi A, Camerini F, Cinco M, Trevisan G (1993) Isolation of *Borrelia burgdorferi* from myocardium. Lancet 342-490

Lengl-Janßen B, Strauss AF, Steere AC, Kamradt T (1994) The T helper cell response in Lyme-Arthritis: Differential recognition of *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A in patients with treatment-resistant or treatment-responsive Lyme-Arthritis. *J Exp Med* 180:2069-2078

Lim LCL, England DM, Glowacki NJ, DuChateau BK, Schell RF (1995) Involvement of CD4+ T lymphocytes in induction of severe destructive Lyme-Arthritis in inbred LSH hamsters. *Infect Immun* 63:4818-4825

Lin B, Kidder JM, Noring R, Steere AC, Klempner MS, Hu LT (2001) Differences in synovial fluid levels of matrix metalloproteinases suggest separate mechanisms of pathogenesis in Lyme arthritis before and after antibiotic treatment. *J Infect Dis* 184(2):174-80

Lünemann JD, Zarma S, Priem S, et al. (2001) Rapid typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in specimens from patients with different manifestations of Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 39:1130-1133

Ma Y, Seiler KP, Tai KF, Yang L, Woods M, Weiss JJ (1994) Outer surface Lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* stimulate nitric oxide by the Cytokine-inducible pathway. *Infect Immun* 62:3663-3671

Ma Y, Weiss JJ (1993) *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoproteins OspA and OspB possess B-cell mitogenic and cytokine-stimulatory properties. *Infect Immun* 61:3843-3853

Maiwald M, Oehme R, March O et al. (1998) Transmission risk of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks to humans in southwest Germany. *Epidemiol Infect* 121:103-108

Manetti R, Parronchi P, Guidizi MG, Piccini MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S (1993) Natural killer cell stimulatory factor interleukin 12 (IL-12) induces T helper type 1 (Th-1)-specific immune response and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. *J Exp Med* 177:1199-1204

Marconi RT, Samuels DS, Landry RK, Garon CF (1994) Analysis of the distribution and molecular heterogeneity of the OspD gene among the Lyme disease spirochetes: Evidence for lateral gene exchange. *J Bacteriol* 176:4572-4582

Matyniak JE, Reiner SL (1995) T helper phenotype and genetic susceptibility in experimental Lyme disease. *J Exp Med* 181:1251-1254

Muellegger RR, McHugh G, Ruthazer R, Binder B, Kerl H, Steere AC (2000) Differential expression of cytokine mRNA in skin Specimens from patients with erythema migrans or acrodermatitis chronica atrophicans. *J Invest Dermatol* 115:1115-1123

Nadelman RB, Wormser GP (1998) Lyme borreliosis. *Lancet* 352:557-565

Nadelmann RB, Nowakowski J, Fish D et al. (2001) Prophylaxis with single dose doxycycline for the prevention of Lyme disease after an *Ixodes scapularis* tick bite. *N Engl J Med* 345:79-84

Nocton JJ, Dressler F, Rutledge BJ, Rys PN, Persing DH, Steere AC (1994) Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme-Arthritis. *N Engl J Med* 330:229-234

Nocton JJ, Steere AC (1995) Lyme disease. *Adv Int Med* 40:69-117

Nocton JJ, Bloom BJ, Rutledge BJ, Persing DH, Logigian EL, Schmid CH Steere AC (1996) Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis. *J Infect Dis* 174:623-627

Norris SJ, Carter CJ, Howell JK, Barbour AG (1992) Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect Immun* 60:3620-3623

Pacher AR, Duray S, Steere AC (1989) Central nervous system manifestations of Lyme disease. *Arch Neurol* 46:790-795

Padula SJ, Dias F, Sampieri A, Craven RB, Ryan RW (1994) Use of recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* for serodiagnosis of early Lyme disease. *J Clin Microbiol* 32:1733-1738

Peña CA, Mathews AA, Siddiqi NH, et al. (1994) Antibacterial therapy for Lyme disease in a population-based cohort. *Clin Inf Dis* 29:694-695

Pfister HW, Einhäupl KM (1986) Lyme-Borreliose – Eine durch *Borrelia burgdorferi* hervorgerufene Multisystemerkrankung. *Internits Welt* 3:76-84

Pohl-Koppe A, Balashov KE, Steere AC, Logigian EL, Hafler DA (1998) Identification of a T Cell Subset Capable of both IFN-gamma and IL-10 Secretion in Patients with Chronic *Borrelia burgdorferi* Infection. *J Immunol* 160:1804-1810

Preac-Mursic V, Wilske B, Patsouris E, Jauris S, Will G, Soutschek E, Reinhardt S, Lehnert G, Klockmann U, Mehraein P (1992) Active immunization with pC protein of *Borrelia burgdorferi* protects gebrils against *Borrelia burgdorferi* infection. *Infection* 20:342-349

Priem S, et al. (1998) Detection of *Borrelia burgdorferi* by polymerase chain reaction in synovial fluid membrane, but not in synovial fluid from patients with persisting Lyme-Arthritis after antibiotic therapie. *Ann Rheum Dis* 57:118-121

Priem S, Munkelt K, Franz JK, Schneider U, Werner T, Burmester GR, Krause A (2002) Epidemiologie und Therapie der Lyme-Arthritis und anderer Manifestationen der Lyme-Borreliose in Deutschland: Ergebnisse einer bundesweiten Ärzteumfrage. Eingereicht zur Veröffentlichung

Radolf JD, Norgard MV, Brandt ME, Isaacs RD, Thompson PA, Beutler B (1991) Lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum* activate cachectin/tumor necrosis factor synthesis. *J Immunol* 147:1968-1974

Radolf JD, Arndt LL, Akins DR, Curetty LL, Levi ME, Shen Y, Davis LS, Norgard MV (1995) *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages. *J Immunol* 154:2866-2877

Rao RD, Frey AB (1995) Protective resistance to experimental *Borrelia burgdorferi* infection of mice by adoptive transfer of a CD4+ T cell clone. *Cell Immunol* 162:225-234

Reiner SL, Locksley RM (1995) The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Ann Rev Immunol* (13:151-177

Roessner K, Fikrig E, Russel JQ, Cooper SM, Flavell RA, Budd RC (1994) Prominent T lymphocyte response to *Borrelia burgdorferi* from peripheral blood of unexposed donors. *Eur J Immunol* 24:320-324

Romagnani S (1994) Lymphokine production of human T cells in disease states. *Ann Rev Immunol* 12:227-257

Ruderman EM, Kerr JS, Telford SR, Spielman A, Glimcher LH, Gravallesse EM (1995) Early murine carditis has a macrophage predominance and is independent of major histocompatibility complex class II-CD4+ T Cell interactions. *J Infect Dis* 171:362-370

Sadziene A, Rosa PA, Thompson PA, Hogan DM, Barbour AG (1992) Antybody-resistant mutants of *Borrelia Burgdorferi*: in vitro selection and characterization. *J EXP Med* 176:799-809

Sadziene A, Barbour AG, Rosa PA, Thomas DD (1993) An *OspB* mutant of *Borrelia Burgdorferi* has reduced invasiveness in vitro and reduced infectivity in vivo. *Infect Immun* 61:3590-3599

Saint Girons I, Old IG, Davidson BE (1994) Molecular biology of the *Borrelia* bacteria with linear replicons. *J Gen Microbiol* 140:1803-1916

Salazar JC, Gerber MA, Goff CW (1993) Long-term outcome of Lyme disease in children given early treatment. *J Pediatr* 122:591-3

Schaible UE, Kramer MD, Museteanu C, Zimmer G, Museteanu H, Simon MM (1989a) The severe combined immunodeficiency (scid) mouse. A laboratory model for the analysis of Lyme arthritis and carditis. *J Exp Med* 170:1427-1432

Schaible UE, Kramer MD, Justus CWE, Museteanu H, Simon MM (1989b) Demonstration of antigen-specific T cells and histopathological alterations in mice experimentally inoculated with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 57:41-47

Schaible UE, Gay S, Museteanu C, Kramer MD, Zimmer G, Eichmann K, Museteanu U, Simon MM (1990) Lyme borreliosis in the severe combined immunodeficiency (scid) mouse manifests predominantly in the joints, heart, and liver. *Am J Pathol* 137:811-820

Schaible UE, Wallich R, Kramer R, Museteanu C, Simon MM (1991) A mouse model for *Borrelia burgdorferi* infection: pathogenesis, immune response and protection. *Behring Inst Mitt* 88:59-67

Schaible UE, Wallich R, Kramer MD, Nerz G, Stehle T, Museteanu C, Simon, MM (1994) Protection against *Borrelia burgdorferi* infection in scid mice is conferred by presensitized spleen cells and partially by B but not T cells alone. *Int Immunol* 6:671-681

Schwan TG, Piesman J, Golde WT, Dolan MC, Rosa PA (1995) Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc Nat Acad Sci* 92:2909-2913

Schwan TG, Hinnebusch BJ (1998) Bloodstream-versus tick-associated variants of a relapsing fever bacterium. *Science* 280:1938-1940

Schwarzenbach R, Djawari D (1999) Multiple erythemata migrantes bei Borreliose im Stadium II. *Monatsschr Kinderheilkd* 147:751-753

Scott P (1993) IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science* 260:496-497

Seder RA, Paul WE (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD-4+ T cells. *Ann Rev Immunol* 12:635-673

Seiler KP, Weiss JJ (1996) Immunity to Lyme disease: protection, pathology and persistence. *Curr Op Immunol* 8:503-509

Shadick NA et al. (1999) Musculoskeletal and neurologic outcomes in patients with previously treated Lyme disease. *Ann Int Med* 131:919-926

Shapiro ED, Gerber MA (2000) Lyme Disease. *Clin Infect Dis* 31:533-542

Sigal LH, Tatum AH (1988) Lyme disease patients' serum contains IgM antibodies to *Borrelia burgdorferi* that cross-react with neurological antigens. *Neurology* 38:1439-1442

Sigal LH (1993) Cross-reactivity between *Borrelia burgdorferi* flagellin and a human axonal 64 000 MW protein. *J Infect Dis* 176:1372-1378

Sigal LH (1997) Lyme disease. a review of aspects of its immunity and immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 15:63-92

Sigal LH (1998) Musculoskeletal manifestations of Lyme-Arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 24:323-351

Simpson WJ, Schrupf ME, Schwan TG (1990) Reactivity of human Lyme borreliosis sera with a 39 kDa antigen specific to *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 28:1329-1337

Sprenger H, Kreuse A, Kaufmann A, Priem S, Fabian D, Burmester GR, Gemsa d, Rittig MG (1997) *Borrelia burgdorferi* induces chemokines in human monocytes. *Infect Immun* 65:4384-4388

Stanek G, Klein J, Bittner R, glogar D (1990) Isolation of *B. burgdorferi* from the myocardium of a patient with longstanding cardiomyopathy. *N Engl J Med* 322:249-252

Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, et al. (1977) Lyme-Arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum* 20:7-17

Steere AC, Grodzicki RL, Kornblatt AN, et al. (1983) The spirochetal etiology of Lyme disease. *N Engl J Med* 308:733-740

Steere AC (1989) Lyme disease. *N Engl J Med* 308:586-596

Steere AC, Levin RE, Molloy PJ, et al. Treatment of Lyme-Arthritis (1994) *Arthritis Rheum* 37:878-888

Steere AC (2001) Lyme disease. *N Engl J Med* 345:115-125

Steere AC, Gross D, Meyer AL, Huber BT (2001) *J Autoimmun* 16 (3):263-268

Stiernstedt GT, Granström M, Herderstedt B, Sköldenberg B (1985) Diagnosis of spirochetal meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescent assay in serum and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 21:819-825

Strle F, Pleterky-Rigler D, Stanek G, Pejovik-Pustinek A, Ruzic E, Cimperman J (1992) Solitary Borrelial Lymphocytoma: Report of 36 cases. *Infection* 20:201-206

Strle F, Nadelmann RB, Cimperman J, et al. (1999) Comparison of culture-confirmed erythema migrans caused by *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in New York state and by *Borrelia afzelii* in Slovenia. *Ann Intern Med* 130:32-36

Thompson C, Spielman A, Krause P (2001) Coinfecting deer-associated zoonoses. Lyme disease, babesiosis and ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 33:676-685

Trinchieri G (1995) Interleukin 12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Ann Rev Immunol* 13:251-276

Vignes F Des, Piesman J, Heffermann R et al. (2001) Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophilia* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J Infect Dis* 183:773-778

Wang G, Dam AP van, Schwartz I, Dankert J (1999) Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 12:633-653

Wang IN, Dykhuizen DE, Qiu W, Dunn JJ, Bosler EM, Luft BJ (1999) Genetic diversity of OspC in a lokal population of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Genetics* 151:15-30

Weir et al. 1978

Weiss JJ, Ma Y, Erdile LF (1994) Biological activities of native and recombinant *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A: Dependence on lipid modification. *Infect Immun* 62:4632-4636

Wilke M, Eiffert H, Christen HJ et al. (2000) Primarily chronic and cerebrovascular course of Lyme neuroborreliosis: case reports and literature review. Arch Dis Child 83:67-71

Wilske B, Schierz G, Preac-Mursic V, Pfister HW, Weber K, von Busch K, Baruschke A (1989) IgM and IgG immune response to *Borrelia burgdorferi* in erythema migrans and neuroborreliosis. Zbl. Bakt (Suppl.) 18:290-298

Wilske B, Bader L, Pfister HW, Preac-Mursic V (1991) Diagnostik der Lyme-Neuroborreliose. Fortschr Med 22:441-446

Wilske B, Preac-Mursic V (1993) Microbiological diagnosis of Lyme Borreliosis. In: K Weber and W Burgdorfer, Aspects of Lyme Borreliosis. Berlin Heidelberg New York, Springer Verlag, pp 267-300

Wilske B, Preac-Mursic V, Jauris-Heipke S, Hofmann A, Pradel I, Soutschek E, Schwab E, Will G, Wanner G (1993a) Immunological and molecular polymorphism of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun 61:2182-2191

Wilske B, Preac-Mursic V, Göbel UB, Graf B, Jauris-Heipke S, Soutschek E, Schwab E, Zumstein G (1993d) An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. J Clin Microbiol 31:340-350

Wilske B, Fingerle V, Preac-Mursic V, Jauris-Heipke S, Hofmann A, Loy H, Pfister HW, Rössler D, Soutschek E (1994) Immunoblot using recombinant antigens derived from different species of *B. burgdorferi sensu lato*. Med Microbiol Immunol 183:43-59

Wilske B, Jauris-Heipke S, Lobentanzer R, Pradel I, Preac-Mursic V, Rössler D, Soutschek E, Johnson RC (1995) Phenotypic analysis of outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi sensu lato* by monoclonal antibodies: relationship to genospecies and OspA serotype. J Clin Microbiol 33:103-109

Wilske B, Habermann C, Fingerle V, Hillenbrandt B, Jauris-Heipke S, Lehnert G, Pradel I, Rössler D, Schulte-Spechtel U (1999) An improved recombinant IgG immunoblot for serodiagnosis of Lyme borreliosis. Med Microbiol Immunol 188:139-144

Windhagen A, Anderson DE, Carroza A, Williams RE, Hafler DA (1996) IL-12 induces human T cells secreting IL-10 with IFN-gamma. J Immunol 157:1127-1131

Woelfle J, Wilske B, Haverkamp F, Bialek R (1998) False-positive serological tests for Lyme disease in facial palsy and varicella zoster meningoencephalitis. Eur J Pediatr 157:953-954

Wooten RM, Modur VR, McIntyre TM, Weiss JJ (1996) *Borrelia burgdorferi* outer membrane protein A induces nuclear translocation of nuclear factor- κ B and inflammatory activation in human endothelial cells. J Immunol 157:4584-4590

Wormser GP, Bittker S, Cooper D, Nowakowski J, Nadelman RB, Pavia C (2000a) Comparison of the yields of blood cultures using serum or plasma from patients with

early Lyme disease. *J Clin Microbiol* 38:1648-1650

Wormser GP, Nadelman RB, Dattwyler RJ et al. (2000b) Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. *Clin Infect Dis (Suppl)*: S1-S14

Yssel H, Shanafelt M-C, Sonderberg C, Schneider PV, Anzola J, Peltz G (1991) *Borrelia burgdorferi* activates a T helper type 1-like T cell subset in Lyme-Arthritis. *J Exp Med* 174:593-601

Zhang JR, Norris SJ (1998) Genetic variation of the *Borrelia burgdorferi* gene *vlsE* involves cassette-specific, segmental gene conversion. *Infect Immun* 66:3698-3704

Zhong W, Stehle T, Museteanu C, Siebers A, Gern L, Kramer M, Wallich R, Simon MM (1997) Therapeutic passive vaccination against chronic Lyme disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12533-12538

Zoschke DC, Skemp AA, Defosse DL (1991) Lymphoproliferative Responses to *Borrelia Burgdorferi* in Lyme Disease. *Ann Intern Med*; 114:285-289

Tabelle I: Patienten mit kutanen Manifestationen einer akuten Lyme-Borreliose: Erythema migrans (EM), Borrelien-Lymphozytom (BL)

	Patient	Alter		ZS ^a	Diagnose	Serum ELISA		LPA ^b	EKG	BKS	CRP (mg/dl)	Sonstiges	Therapie
		Geschlecht				IgM (OD)	IgG (U/ml)						
lokalisiert	MAS (S)	7	m	+	EM	0,302	negativ	d.	o.B.	n.d.	< 1,0		Ceftr 10d
	FP	8	w	+	EM	negativ	negativ	d.	n.d.	16/33	< 1,0		Eryt 10d
	AH (S)	10	w	+	EM	negativ	negativ	d.	n.d.	n.d.	< 1,0	2	Amox 10d
	PS	10	m	-	EM	0,691	23	d.	n.d.	21/53	< 1,0	3	Amox 21d
generalisiert	CAS (S)	4	w	+	EM, BL	0,682	negativ	n.d.	o.B.	13/38	1,8	2,3,4	Amox 10d, Cefo 21 d
	AP (S/P)	4	m	-	EM, BL	negativ	6	d.	o.B.	n.d.	< 1,0	1,2,4	Amox 35d
	DM (S/P)	5	m	-	multiple EM	2,646	12	d.	o.B.	10/24	< 1,0	1	Amox 21d
	ARÖ (S/P)	5	w	+	EM, BL	negativ	350	d.	o.B.	n.d.	1,2	1,3	Amox 21d
	CC	6	m	+	BL	negativ	negativ	d.	n.d.	n.d.	< 1,0		Amox 21d
	MB	8	w	+	BL	negativ	131	d.	n.d.	7/19	< 1,0		Cefur-A 14d, Amox 21d
	NS (S/P)	8	w	-	BL	negativ	250	d.	o.B.	2/8	< 1,0		Amox 10d, Cefur-A 35d
	UB (S)	11	w	++	EM ^x , BL	negativ	63	d.	o.B.	8/22	< 1,0		Cefur-A 14d

^a ZS = Zeckenstich. ^b LPA = Lymphoproliferations-Assay. ^x EM anamnestisch 7 Monate vor Diagnosestellung.

(S) = Serologische Kontrolluntersuchung, (P) = Wiederholung des Lymphoproliferations-Assays durchgeführt.

- = kein ZS erinnerlich, (-) = kein ZS, jedoch besonders häufiger Aufenthalt in Wald/ländlicher Gegend, (+) = ZS bei Familienmitglied, ++ = ZS erinnerlich, ++ = multiple ZS.

1 = Fieber, 2 = Lymphadenopathie, 3 = Kopfschmerzen, 4 = Malaise, 5 = Meningismus, 6 = Arthralgien.

Ceftr = Ceftriaxon, Eryt = Erythromycin, Amox = Amoxicillin, Cefo = Cefotaxim, Cefur-A = Cefuroxim-Axetil.

d. = Analyse durchgeführt, n.d. = Analyse nicht durchgeführt.

Tabelle II: Patienten mit Neuroborreliose: Fazialisparesen (FP)

Patient	Alter		ZB ^a	Diagnose	Serum ELISA		Liquor		LPA ^c	EKG	CRP	BKS	Sonstiges	Therapie
	Geschlecht				IgM (OD)	IgG (U/ml)	ELISA ^b	Zellen/ μ l						
NJ	4	w	-	FP, EM	0,443	negativ	reaktiv ^{d+}	292	n.d.	n.d.	< 1,0	n.d.	1,2,3,4	Ceftr 14d
RS	4	m	-	FP	0,371	negativ	negativ ^{e-}	1	n.d.	n.d.	< 1,0	n.d.		Ceftr 14d
TS (S)	5	m	+	FP	0,560	negativ	negativ	14	n.d.	o.B.	< 1,0	5/15	2,3	Cefo 7d, Ceftr 7d
MTB	6	w	-	FP, EM	1,398	negativ	negativ	6	n.d.	n.d.	< 1,0	n.d.	1,2	Ceftr 14d
FS (S)	7	m	(+)	FP	1,154	negativ	reaktiv ^{d+}	500	n.d.	n.d.	< 1,0	n.d.		Cefo 10d, Ceftr 10d
MER (S,P)	7	w	-	FP	0,656	10	n.d.	n.d.	d.	n.d.	< 1,0	7/19		Ceftr 14d
IZ	8	w	-	FP	0,429	negativ	reaktiv	0	d.	o.B.	< 1,0	n.d.		Cefo 14d
JR (S)	8	m	-	FP	0,462	negativ	negativ ^{d-}	2	n.d.	n.d.	< 1,0	n.d.		Cefo 14d
CH (S)	9	m	(-)	FP	0,739	negativ	negativ	120	n.d.	o.B.	< 1,0	n.d.	3,4	Cefo 10d, Ceftr 10d
SST (S)	9	w	+	FP, mEM	1,022	15	reaktiv ^{d+}	93	d.	o.B.	< 1,0	n.d.	4	Cefo 14d
AHI	10	m	+	FP	negativ	negativ	reaktiv	270	d.	n.d.	< 1,0	n.d.		Cefo 14d
COH	10	w	-	FP	0,826	5	negativ	42	n.d.	n.d.	< 1,0	25/63	3	Cefo 14d
MT	13	m	-	FP, mEM	1,928	19	reaktiv ^{d+}	93	n.d.	n.d.	< 1,0	n.d.	2	Ceftr 10d
ARI	14	w	-	FP	0,469	negativ	negativ ^{e-,f-}	2	n.d.	n.d.	< 1,0	n.d.		Amox 10d

^a ZS = Zeckenstich. ^b IgM- und/oder IgG-Antikörper. ^c LPA = Lymphoproliferations-Assay. ^d Liquor/Serum-Index. ^e Borrelien-PCR durchgeführt. ^f Oligoklonale Banden.

(S) = Serologische Kontrolluntersuchung, (P) = Wiederholung des Lymphoproliferations-Assays durchgeführt.

- = kein ZS erinnerlich, (-) = kein ZS, jedoch besonders häufiger Aufenthalt in Wald/ländlicher Gegend, (+) = ZS bei Familienmitglied, + = ZS erinnerlich, ++ = multiple ZS.

1 = Fieber, 2 = Lymphadenopathie, 3 = Kopfschmerzen, 4 = Malaise, 5 = Meningismus, 6 = Arthralgien.

Ceftr = Ceftriaxon, Cefo = Cefotaxim, Amox = Amoxicillin.

d. = Analyse durchgeführt, n.d. = Analyse nicht durchgeführt.

Tabelle III: Patienten mit Neuroborreliose: aseptische Meningitis (aM)

Patient	Alter		ZS ^a	Diagnose	Serum ELISA		Liquor		LPA ^c	EKG	CRP	BKS	Sonstiges	Therapie	
	Geschlecht				IgM (OD)	IgG (U/ml)	ELISA ^b	Zellen/ μ							
HS	4	w	(+)	aM, FP, mEM	1,339	negativ	reaktiv	10	d.	o.B.	< 1,0	5/15	3	Ceftr 7d, Pen 5 d	
KF	(S)	4	w	-	aM, FP	0,324	negativ	reaktiv ^{e+}	50	n.d.	n.d.	< 1,0	n.d.	1,2,3,4,5	Cefo 14d
GK		6	m	+	aM, AP, HN	0,905	110	reaktiv ^{e+}	28	n.d.	n.d.	< 1,0	n.d.		Cefo 14d
LM	(S)	6	w	+	aM, FP	1,249	57	reaktiv	683	d.	n.d.	< 1,0	n.d.	3,4	Ceftr 21d
RA	(S)	6	m	+	aM, FP, EM	negativ	negativ	negativ	23	n.d.	n.d.	< 1,0	19/45	1,2,5	Cefo 14d
PLC	(S/P)	6	m	(-)	aM	0,887	67	reaktiv ^{d+,f+}	0	d.	AVB	< 1,0	n.d.	3	Cefo 10d, Ceftr 4 d
MW	(S/P)	8	m	-	aM	1,369	negativ	reaktiv ^{d+}	47	d.	n.d.	< 1,0	29/60	3	Cefo 14d
KM		8	m	+	aM, FP, EM	0,679	17	negativ	75	d.	n.d.	< 1,0	2/5	3	Ceftr 14d
SW	(S)	8	w	+	aM, FP	1,283	negativ	negativ	81	d.	n.d.	< 1,0	n.d.		Ceftr 21d
PVR		9	m	(-)	aM	1,250	6	reaktiv	7	n.d.	o.B.	< 1,0	35/57	3,5	Ceftr 14d
AB		10	w	+	aM	1,790	11	reaktiv	453	d.	n.d.	< 1,0	18/50	3,4	Cefo 7d, Ceftr 7d
MP	(S)	10	w	-	aM, AP	0,377	250	reaktiv ^{d+}	9	d.	n.d.	< 1,0	n.d.		Ceftr 14d
RK	(S/P)	11	m	-	aM, FP	0,839	negativ	negativ	26	d.	n.d.	< 1,0	n.d.		Cefo 9d, Ceftr 5d
JHA	(S/P)	13	w	-	aM	2,062	6	reaktiv	52	d.	n.d.	< 1,0	n.d.	3,5	Ceftr 14d

^a ZS = Zeckenstich. ^b IgM- und/oder IgG-Antikörper. ^cLPA = Lymphoproliferations-Assay. ^d Liquor/Serum-Index. ^e Borrelien-PCR durchgeführt. ^f Oligoklonale Banden.

(S) = Serologische Kontrolluntersuchung, (P) = Wiederholung des Lymphoproliferations-Assays durchgeführt.

AP = Abduzensparese, HN = Beteiligung der Hirnnerven V und VII, AVB = AV-Block I°

- = kein ZS erinnerlich, (-) = kein ZS, jedoch besonders häufiger Aufenthalt in Wald/ländlicher Gegend, (+) = ZS bei Familienmitglied, + = ZS erinnerlich, ++ = multiple ZS.

1 = Fieber, 2 = Lymphadenopathie, 3 = Kopfschmerzen, 4 = Malaise, 5 = Meningismus, 6 = Arthralgien.

Ceftr = Ceftriaxon. Pen = Penicillin G. Cefo = Cefotaxim.

Tabelle IV: Patienten mit Neuroborreliose: Bannwarth-Syndrom (Polymeningoradikulitis, PMR) und andere neurologische Manifestationen

Patient	Alter	Geschlecht	ZS ^a	Diagnose	Serum ELISA		Liquor		LPA ^c	EKG	CRP	BKS	Sonstiges	Therapie	
					IgM (OD)	IgG (U/ml)	ELISA ^b	Zellen/ μ l							
MS	(S)	4	m	+	Ataxie	1,787	6 ^{e+}	reaktiv ^{e-}	2	n.d.	n.d.	< 1,0	24/50		Cefo 4d, Amox 14d
JH	(S/P)	9	m	-	PMR, aM, mEM	1,748	negativ	reaktiv ^{e-}	600	d.	o.B.	< 1,0	8/22	3	Ceftr 12d
EH		9	m	-	PMR, aM, EM	negativ	negativ	reaktiv ^{d+}	220	d.	o.B.	< 1,0	n.d.	3,4	Ceftr 14d
AA	(S/P)	9	w	+	PMR, FP, EM	0,551	negativ	reaktiv ^{d+}	n.d.	d.	M	< 1,0	n.d.	1,3,4	Cefo 4d, Ceftr 10d
IB	(S)	11	w	+	PMR	1,185	150	reaktiv	9	n.d.	o.B.	< 1,0	8/24	3	Cefo 14d
UW		11	m	+	chron. KS	0,573	200	reaktiv ^{e-}	1	n.d.	n.d.	< 1,0	n.d.	3	Ceftr 14d
MZ		12	m	++	chron. KS	negativ	98	reaktiv ^{d-}	2	d.	AVB RSB	< 1,0	5/12	3	

^a ZS = Zeckenstich. ^b IgM- und/oder IgG-Antikörper. ^c LPA = Lymphoproliferations-Assay. ^d Liquor/Serum-Index. ^e Borrelien-PCR durchgeführt.

(S) = Serologische Kontrolluntersuchung, (P) = Wiederholung des Lymphoproliferations-Assays durchgeführt.

KS = Kopfschmerzen

M = V.a. Myokarditis

AVB = AV-Block I°

RSB = Rechtsschenkel-Block

- = kein ZS erinnerlich, (-) = kein ZS, jedoch besonders häufiger Aufenthalt in Wald/ländlicher Gegend, (+) = ZS bei Familienmitglied, + = ZS erinnerlich, ++ = multiple ZS.

1 = Fieber, 2 = Lymphadenopathie, 3 = Kopfschmerzen, 4 = Malaise, 5 = Meningismus, 6 = Arthralgien.

Cefo = Cefotaxim, Amox = Amoxicillin, Ceftr = Ceftriaxon.

d. = Analyse durchgeführt, n.d. = Analyse nicht durchgeführt.

Tabelle V: Patienten mit Lyme-Arthritis

Patient	Alter		ZS ^a	Lokalisation	Serum ELISA		LPA ^b	EKG	CRP (mg/dl)	BKS	Sonstiges	Therapie
	Geschlecht				IgM (OD)	IgG (U/ml)						
DR	9	m	(-)	Knie rechts	0,590	> 410	d.	RSB	< 0,1 ^c	n.d.	3,6	Cefur 5d, Ceftr 12d
PW (S) ^c	9	m	+	Knie bds	negativ	420	d.	o.B.	7,89 ^d	10/22	6	Amox 21d
PN (S,P)	10	m	++	Sprunggelenk links	negativ	> 480	d.	o.B.	< 0,1 ^c	18/30	6	Ceftr 10d
DB	11	m	-	Ellenbogen links	0,368	> 280	d.	o.B.	4,9 ^e	22/46	3,6	Amox 28d
SG (S,P)	12	m	++	Knie links	negativ	> 290	d.	o.B.	< 0,1 ^c	n.d.	3	Ceftr 14d
DZ (S)	12	m	+	Knie rechts	0,365	> 580	d. ^e	o.B.	< 0,1 ^c	42/62	6	Amox 21d
EF	14	w	++	Knie rechts, EM ^f	negativ	> 520	d.	RSB	< 0,1 ^c	n.d.		Doxy 35d, Ceftr 33d

^a ZS = Zeckenstich. ^b LPA = Lymphoproliferations-Assay. ^c CRP-Wert nach Beginn der antibiotischen Therapie. ^d CRP-Wert vor Beginn der antibiotischen Therapie. ^e Z.n. Lyme-Arthritis vor 2,5 Jahren (Kontrolluntersuchung). ^f EM vor 2 Jahren, antibiotische Therapie für 2 Wochen. (S) = Serologische Kontrolluntersuchung, (P) = Wiederholung des Lymphoproliferations-Assays durchgeführt.

- = kein ZS erinnerlich, (-) = kein ZS erinnerlich, jedoch besonders häufiger Aufenthalt in Wald/ländlicher Gegend, (+) = ZS eines Familienmitgliedes,

+ = ZS erinnerlich, ++ = multiple ZS.

RSB = Rechtsschenkelblock.

1 = Fieber, 2 = Lymphadenopathie, 3 = Kopfschmerzen, 4 = Malaise, 5 = Meningismus, 6 = Arthralgien.

Cefur = Cefuroxim, Ceftr = Ceftriaxon, Amox = Amoxicillin, Doxy = Doxycyclin.

d. = Analyse durchgeführt, n.d. = Analyse nicht durchgeführt.

Tabelle VI: Kontrollpatienten

Kontrollen	Alter (Jahre)	Ge- schlecht	Zecken- stich	Diagnose	Lyme Serologie (ELISA)
PM	1	m	-	gesund	negativ
LMR	2	w	-	gesund	negativ
JT	3	w	-	idiopathische Fazialisparese	negativ
KD	4	w	-	idiopathische Fazialisparese	negativ
ED	5	w	-	gesund	negativ
NW	6	m	-	gesund	negativ
JW	8	w	-	gesund	negativ
SS	9	w	-	Bauchschmerzen	negativ
JS	9	m	-	atopisches Ekzem, superinfiziert	negativ
NZ	9	w	-	Iritis	negativ
PP	9	w	-	Postinfektiöse Leukopenie	negativ
KB	9	w	+	Sinusitis	negativ
KG	9	w	-	idiopathische Fazialisparese	negativ
CS	10	w	-	Akute Arthritis	negativ
LS	10	w	-	idiopathische Fazialisparese	negativ
AT	10	m	-	idiopathische Fazialisparese	negativ
LKF	11	w	-	Chronische Hepatitis B	negativ
MF	11	m	-	Chronische Hepatitis B	negativ
SC*	12	m	-	gesund	negativ
EM*	14	m	-	Renal-tubuläre Azidose	negativ
IM*	15	m	-	Struma	negativ
AK*	24	w	-	gesund	negativ
JB*	38	m	-	gesund	negativ

*Seronegative Kontrollpatienten, deren Blut ausschließlich für Vorversuche zur Etablierung der Lymphoproliferations-Assays verwendet wurde.

Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
BL	Borrelien Lymphozytom
IB	Immunoblot
LA	Lyme-Arthritis
NB	Neuroborreliose
PBMC	Periphere blutmononukleäre Zellen
EM, mEM	Erythema chronicum migrans, multiple Erythemata migrantes
AK	Antikörper
FP	Fazialisparese
aM	Aseptische Meningitis
PMR	Polymeningoradikulitis, Bannwarth Syndrom
IB	Immunoblot Analyse
IFT	Immunofluoreszenztest
TT	Tetanustoxoid, Recall-Antigen
B.b.	Borrelia burgdorferi
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
CSF	Liquor cerebrospinalis
HSP	Heat Shock Proteine
PCR	Polymerase Kettenreaktion

curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Angelika Kaunicnik
Geboren: 20. Mai 1974 in Starnberg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig, 2 Kinder

Schulbildung:

09/80 – 07/84 Ferdinand-Maria Grundschule, Starnberg
09/84 – 05/93 Gymnasium der Benediktiner Kloster Schäftlarn, Abitur

04/94 – 04/03 Studium der Humanmedizin, LMU München:

09/96 Ärztliche Vorprüfung
08/97 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/00 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/03 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

04/00 – 08/00 Dr. von Haunersches Kinderspital (Pädiatrie)
08/00 – 09/00 Kinderchirurgische Klinik, Dr. von Haunersches Kinderspital
(Chirurgie)
(09/00 – 03/02 Mutterschafts- und Erziehungszeit)
04/02 – 08/02 Hospital Gineco-Obstetrico Dr. Jaime Sanchez Pórcel,
Sucre, Bolivien (Gynäkologie und Geburtshilfe)
08/02 – 12/02 Hospital Santa Bárbara, Sucre, Bolivien und Städtisches
Krankenhaus München Schwabing (Allgemein- und
Viszeralchirurgie)
12/02 – 03/03 Städtisches Krankenhaus München Schwabing, Station
10K (Innere Medizin, Infektiologie)

Seit 01/04 ärztliche Tätigkeit - bis 10/04 als ÄiP, seither als Assistenzärztin - in der
1. Medizinischen Abteilung (Innere Medizin) des Krankenhaus 3. Orden, Menzingerstr.
44, 80638 München.

Danksagungen

Ich möchte an dieser Stelle vor allem meinen Eltern und Schwiegereltern, sowie meinem Lebensgefährten Georg Vodermaier, herzlich für ihre tatkräftige Unterstützung und rechtzeitige Motivation danken und vor allem für die zeitlichen Freiräume, die sie mir geschaffen haben.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Frau PD Dr. Annette Pohl-Koppe, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte, mir die Grundlagen für den experimentellen Teil der Arbeit sowie für die wissenschaftliche Datenaufbereitung lehrte, mich immer freundschaftlich betreute und Hilfestellung leistete.