

# Was unterscheidet den Lymphozytentransformationstest und den Elispot zur Diagnostik bei chronischer Borreliose?

Petra Hopf-Seidel, Volker von Baehr

Bei der Labordiagnostik der chronischen Borreliose hat der direkte Erregernachweis mittels PCR aus Blut, Liquor und Urin wegen der geringen Sensitivität kaum eine Bedeutung. Deshalb steht nur der indirekte Erregernachweis zur Verfügung, d. h. die Erfassung der Reaktion des Immunsystems auf die Borrelien. Das Immunsystem reagiert mit der Bildung von Antikörpern (humoral) und zellulär, also mit der Prägung von T-Lymphozyten, die in der aktiven Erkrankungsphase als Effektorzellen im Blut zirkulieren und als Gedächtnislymphozyten später oft lebenslang persistieren können. In der vorliegenden Arbeit werden die beiden heute gebräuchlichen Verfahren der zellulären Diagnostik mit ihren Stärken und Schwächen vorgestellt.

Schlüsselworte: Lymphozytentransformationstest, Elispot, Borreliose, Sensitivität, Spezifität

Keywords: Lymphocyte transformation test, Elispot, Lyme disease, sensitivity, specificity

## Wie funktionieren LTT und Elispot?

Sowohl der Lymphozytentransformationstest (LTT) als auch der Elispot weisen im Blut eines Patienten spezifische T-Zellen nach, die gegen definierte Testantigene gerichtet sind. In der vorliegenden Arbeit soll es ausschließlich um die Borreliosedagnostik gehen.

Beide Tests benötigen 10 bis 20 ml venöses Heparinblut, der LTT zusätzlich 5 ml Vollblut zur Serumgewinnung. Aus dem Blut werden spätestens 24 h nach der Blutabnahme die Lymphozyten und Monozyten durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Nach mehreren Zentrifugations- und Waschvorgängen werden die Patientenzellen in ein Zellkulturmedium aufgenommen, durch Verdünnung in Relation zur ermittelten Zellzahl auf eine definierte Zellkonzentration eingestellt und in 96-Well-Zellkulturplatten überführt. In diese Zellkulturen werden anschließend die zu testenden Borrelienantigene gegeben. Diese Primärzellkulturen werden dann unter optimalen Zell-Wachstumsbedingungen bei 37 °C für 6 Tage (LTT) bzw. 24 Stunden (Elispot) inkubiert. Beim LTT ist wegen der längeren Zellkulturzeit eine permanente

Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> in speziellen Zellinkubatoren notwendig sowie zur Optimierung der Antigenpräsentation die Zugabe von Interferon-alpha zur Zellkultur.<sup>1</sup> Ansonsten ist das Analyseprinzip aber bis zu diesem Punkt sehr ähnlich, wobei die 6 Tage andauernde Zellkultur beim LTT methodisch deutlich aufwändiger ist als die 24-stündige Kurzzeitkultur des Elispot. Beim Elispot ist die Gefahr der Keimkontamination durch die kürzere Kulturzeit zu vernachlässigen, weshalb keine streng sterile Arbeitsweise notwendig ist. Im Unterschied zum LTT, der ein Zellkulturlabor erfordert, kann der Elispot auch in einem gewöhnlichen Labor ohne größeren technischen und personellen Aufwand durchgeführt werden. Das ist ein wesentlicher Grund dafür, dass der Elispot preiswerter angeboten werden kann im Vergleich zum LTT und erklärt auch, warum Labore ohne Zellkultur Erfahrung den Elispot als die bevorzugte Testvariante wählen.

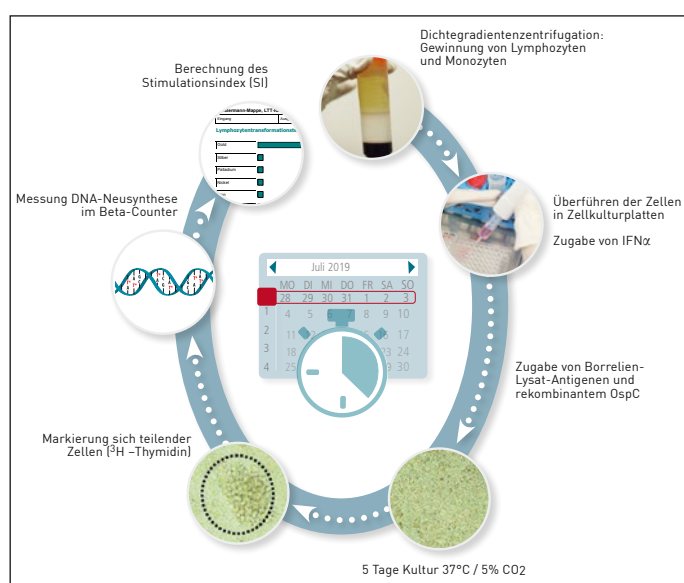


Abb. 1: Methodischer Ablauf des LTT



IMD

Labor Berlin

Ärztlicher Befundbericht

Testansätze - Borrelienantigene

|                     |  | SI  |
|---------------------|--|-----|
| Borr. sensu stricto |  | 3,6 |
| Borr. afzelii       |  | 6,4 |
| Borr. garinii       |  | 4,2 |
| Borr. OspC          |  | 7,7 |

---

|                            |      |       |
|----------------------------|------|-------|
| Positivkontrolle (Antigen) | 27,8 | 44,3  |
| Mitogenkontrolle (PWM)     | 60,3 | 162,1 |

Stimulationsindizes von > 5 bei der Mitogenkontrolle PWM und > 3 bei der Antigenkontrolle (Tetanus/Cand./Influenza) sichern die Auswertbarkeit der Untersuchung

Es zeigen sich positive LTT-Reaktionen auf Borrelienantigene. Dieser Befund spricht für eine aktive Auseinandersetzung des zellulären Immunsystems mit Borrelien und deutet somit auf eine derzeit aktive Borrelieninfektion hin. Die Reaktivität auf die Lysantigene mehrerer Borrelien-Genospezies ist durch den Gehalt an spezies-übergreifenden Antigenen im Lysantigen zu begründen.

Ein positiver LTT allein stellt auf Grund nicht sicher auszuschließender Kreuzreaktivitäten keine unmittelbare Therapieindikation dar. Eine Therapiekontrolle sollte immer unter Berücksichtigung der Laborbefunde und vor allem des bestehenden klinischen Bildes gestellt werden. Wenn therapiert wird, sollte die Kontrolluntersuchung mit dem LTT frühestens 4-6 Wochen nach Therapieende erfolgen. Nach erfolgreicher Behandlung sind die SI-Werte für die Borrelienantigene deutlich rückläufig bis unauffällig zu erwarten.

Abb. 2: Beispielbefund eines positiven LTT auf Borrelienantigene

## Unterschiede

Beim LTT wird die Zellkultur 5 Tage in einem „Brutschrank“ aufbewahrt. Wenn in der Patientenblutprobe Borrelien-spezifische Effektorzellen waren, vermehren sich diese in den 5 Tagen exponentiell. Zum Nachweis dieser Zellvermehrung wird am 5. Kulturtag 3H-Thymidin, ein radioaktiv-markierter DNA-Baustein, zur Zellkultur hinzugegeben. Danach werden die Zellen für weitere 12 Stunden kultiviert, in denen sich das 3H-Thymidin in alle sich teilenden Lymphozyten einbaut. Da durch die Zellstimulation mit spezifischen Borrelienproteinen ausschließlich Borrelien-spezifische Effektorzellen vermehrt werden, kann über die mittels eines Beta-Counters ermittelte Zellteilungsrate direkt auf die Anzahl der im Blut vorhandenen Borrelien-spezifischen T-Effektorzellen geschlossen werden.

Beim Elispot erfolgt der Nachweis der T-Zellaktivierung anhand der Sekretion von Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) oder Interleukin-2 (IL-2) durch die aktivierten Zellen. Die Zellkultur wird hier auf einer Mikrotiterplatte mit einem Membranboden durchgeführt, die mit Antikörpern gegen die nachzuweisenden Zytokine beschichtet ist. Durch diesen methodischen „Kniff“ werden die im Falle einer Zellaktivierung gebildeten Zytokine sofort gebunden, ehe sie von den aktivierten, sich teilenden Zellen wieder aufgenommen und „verbraucht“ werden. Das erklärt, warum im Gegensatz zum LTT schon nach 24 Stunden der Nachweis der T-Zellaktivierung möglich ist. Die Zytokinbindung wird über die Zugabe Enzym-markierter Antikörper nachgewiesen. Sichtbar werden damit sogenannte „spots“, was den Zytokin-positiven T-Zellen im Kulturansatz entspricht.

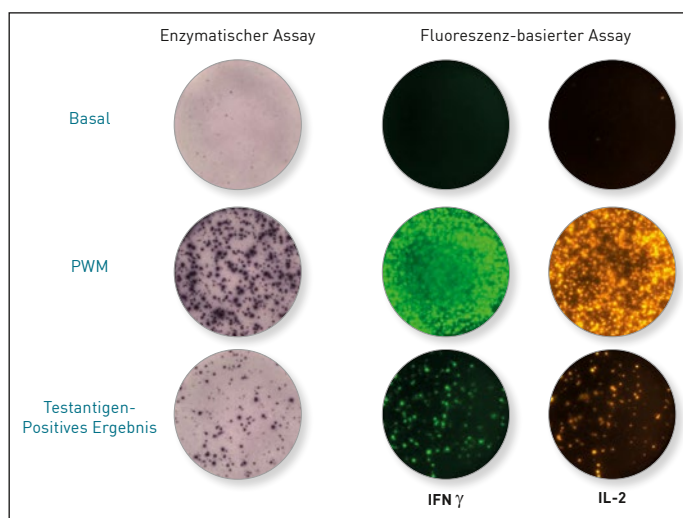


Abb. 3: Illustration positiver und negativer Ergebnisse im Elispot

Bei beiden Tests werden zur Ergebnisdarstellung die Ergebnisse der Borrelien-spezifisch stimulierten Zellaktivierung (also der Zellteilungsrate im LTT bzw. die Anzahl der Zytokin-Spots im Elispot) zu einem Basalwert (Kulturansatz ohne Zugabe von Borrelienantigenen) ins Verhältnis gesetzt. Das Ergebnis wird als Stimulationsindex (SI) dargestellt.

## Vor- und Nachteile des LTT aus Sicht des Labors

Im IMD Berlin liegen Erfahrungen mit beiden Tests vor. Nicht nur für Borrelien sondern, zuletzt auch für den Nachweis von SARS-CoV-2, VZV, EBV und CMV. Beide Testverfahren wurden ausgiebig verglichen.

Vorteilhaft beim Elispot ist, dass weder ein teures Zellkulturlabor noch Zellkulturerfahrung bei den Labormitarbeitern notwendig sind. Die Gefahr einer Kontamination mit Bakterien oder Mykoplasmen ist wegen der nur 24-stündigen Kulturzeit zu vernachlässigen. Das Ergebnis beim Elispot liegt schon nach 24 Stunden vor und nicht erst wie beim LTT nach 6 Tagen, wobei das bei der Fragestellung der chronischen Borreliose wenig bedeutend ist. Ein wichtiger Vorteil ist, dass der Elispot im Unterschied zum LTT kein radioaktives Testverfahren ist. Die Kosten für die Entsorgung von radioaktiv kontaminiertem Labormaterial steigen stetig an. Prinzipiell ist es positiv zu bewerten, dass es sich beim Elispot um einen CE-zertifizierten, kommerziell erhältlichen Testkit handelt. Damit wäre auch die Standardisierung der Testdurchführung zwischen verschiedenen Laboren im Unterschied zum LTT leichter möglich. Bei „in-house“ entwickelten Methoden wie dem LTT ist die Qualität vor allem von den Fähigkeiten und der Erfahrung der Labormitarbeiter und der Ausstattung des Labors abhängig. Der LTT ist daher zwischen verschiedenen Labors deutlich schwerer standardisierbar als wenn man vorkonfektionierte Elispot-Testkits verwendet.

Der Nachteil dieser Standardisierung des Elispots ist allerdings, dass methodische Weiterentwicklungen im Labor selbst nicht möglich sind. Das Labor ist abhängig von den Unternehmen, die diese Tests verkaufen. Die aufwändige CE-Zertifizierung erschwert spätere Testanpassungen. So sehen wir z. B. die Tatsache kritisch, dass beim Elispot als Positivkontrolle lediglich Mitogen verwendet wird und nicht wie beim LTT die weit sensitivere antigenspezifische Positivkontrolle. Die Gefahr nicht erkannter, falsch negativer Resultate z. B. durch Proben transportschäden, immunsuppressive Therapien oder einen Immundefekt des Patienten, ist beim Elispot deshalb höher als beim LTT.

## Ist der Elispot wirklich „sensitiver“ als der LTT?

Von Befürwortern des Elispot wird häufig eine im Vergleich zum LTT höhere Sensitivität als Vorteil angegeben. Hier muss man unterscheiden zwischen der analytischen Sensitivität und der diagnostischen Sensitivität. Letztere bezieht sich auf die Fragestellung, ob aktuell eine aktive und behandlungsbedürftige Borreliose besteht oder nicht. Zudem konnte der beim Elispot oft angegebene Vorteil der höheren analytischen Sensitivität von uns bei den Vergleichsanalysen so nicht bestätigt werden. Wir haben beobachtet, dass im Falle sehr geringer Frequenzen Borrelien-spezifischer T-Zellen im Blut, diese im Elispot im Vergleich zum LTT sogar seltener nachweisbar waren. Diese höhere analytische Sensitivität des LTT ist damit zu erklären, dass die aktivierten T-Zellen über 6 Tage vervielfältigt werden.

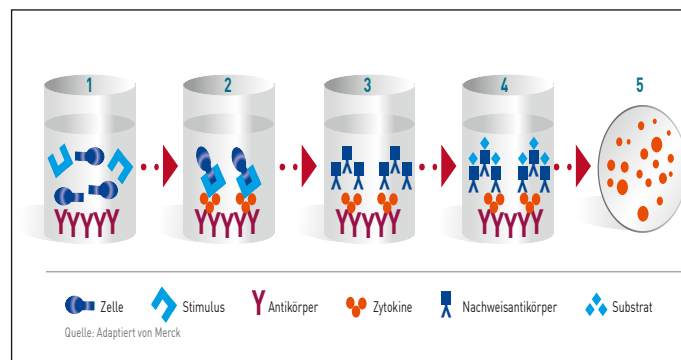


Abb. 4: Methodik des Elispot-Test

### Vergleich beider Verfahren hinsichtlich der Studienlage

Der LTT wurde zum Nachweis Borrelien-spezifischer T-Lymphozyten erstmals 1986 publiziert. Auch wenn damals die Zellkulturbedingungen und die zur Zellstimulation verwendeten Antigene im Vergleich zu heute noch suboptimal waren, konnte man schon damals auf *Borrelia burgdorferi*-Antigene eine signifikante Proliferation von Lymphozyten bei Patienten mit Lyme-Borreliose (LB) zeigen, nicht aber bei Gesunden.<sup>2</sup>

Zwischen 1986 und 2012 wurden insgesamt 11 Studien publiziert, in denen Patienten mit Borreliose im Vergleich zu Kontrollgruppen mit dem LTT untersucht wurden. Sigal et al. untersuchten 49 Patienten mit LB, 41 gesunde Probanden und 12 Patienten mit rheumatoider Arthritis. Bei den Patienten mit LB zeigten sich signifikant höhere LTT-Ergebnisse als in beiden Kontrollgruppen. Nach erfolgreicher antibiotischer Behandlung fiel der LTT signifikant ab. Nur in den Fällen anhaltender Beschwerden trotz antibiotischer Behandlung persistierte auch der LTT.<sup>3</sup>

Die nächste Studie von Dattwyler untersuchte neben 17 gesunden Probanden 35 Patienten mit LB, davon 18 mit Borrelien-spezifischen Antikörpern und 17 Antikörper-negative Patienten (sog. Seronegative). Ein Erythema migrans war bei 15/17 der seronegativen LB-Patienten nachweisbar. Die seronegativen Patienten gaben Fatigue, Gelenkschmerzen, Kopfschmerzen und Gedächtnisstörungen an. Positive LTTs auf Borrelienantigene zeigten sich bei den Patienten mit LB signifikant häufiger als bei den Kontrollen. Dabei unterschieden sich die Stimulationsindizes zwischen seropositiven und seronegativen Patienten nicht. Das Fazit der Autoren war, dass eine chronische LB durch Seronegativität nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Ein positiver LTT bedeutet den Nachweis einer persistierenden Infektion mit Borrelien bei typischen LB-Symptomen. Die Empfehlung der Autoren lautete, dass der LTT bei Verdacht auf chronische LB durchgeführt werden sollte, insbesondere wenn in der Frühphase eine antibiotische Behandlung durchgeführt wurde, die bekanntermaßen die Antikörperbildung reduzieren kann.<sup>4</sup>

In Boston/USA wurde der LTT mit Borrelienantigenen bei 42 Patienten mit LB und 77 nachweislich nicht-borrelieninfizierten Patienten gemacht. 19 der 42 LB-Patienten zeigten einen positiven LTT und nur 4 der 77 Kontrollen. Die Autoren berechnen daraus eine Spezifität von 95 %, wobei die Sensitivität in dieser Studie nur bei 45 % lag.<sup>5</sup>

An der Universität Erlangen untersuchte man mit dem LTT 24 Patienten mit LB, 30 Patienten mit Arthritis anderer Genese und 20 gesunde Kontrollpersonen. Die Studie zeigte signifikant höhere LTT-Stimulationsindizes bei LB-Patienten im Vergleich zu Gesunden und Arthritis-Patienten ohne LB. Nach antibiotischer Behandlung gingen die Stimulationsindizes signifikant zurück. Im Unterschied zu allen früheren Arbeiten setzte man in dieser Studie erstmals autologes (patienteneigenes) Serum in der Zellkultur ein, so wie das auch heute üblich ist. Die spezifische T-Zellantwort fiel bei Zusatz von patienteneigenem Serum deutlich stärker aus.<sup>6</sup>

Eine kleinere Studie der Dermatologischen Klinik der Berliner Charité war eher methodischer Art. Bei 5 LB-Patienten und 7 Gesunden wurde der LTT mit unbehandelten *Borrelia burgdorferi*-Bakterien und mit ultraschallbehandelten und sterilfiltrierten

Erregerbestandteilen durchgeführt. Erwartungsgemäß zeigten sich bei den unbehandelten (nicht gereinigten) Bb-Bakterien unspezifische Reaktionen, d.h. sowohl bei LB-Patienten als auch bei Gesunden. Bei Verwendung des aufgereinigten Sonikates reagierten nur die LB-Patienten im LTT.<sup>7</sup>

Dermatologen der Universität Basel untersuchten 99 LB-Patienten und 21 gesunde Probanden mit dem LTT. In der Patientengruppe waren 25 Patienten mit EM, 16 Patienten mit Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), 13 Patienten mit Lymphozytom und 45 Patienten mit umschriebener Sklerodermie. Der LTT war signifikant erhöht bei LB-Patienten mit EM, ACA und Lymphozytom im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei den LB-Patienten mit umschriebener Sklerodermie waren die LTT-Ergebnisse ebenfalls höher als bei den Kontrollen, erreichten aber kein Signifikanzniveau.<sup>8</sup>

An der Universität Wien zeigten sich bei 80 LB-Patienten positive LTT-Resultate und höhere Stimulationsindizes als bei 24 parallel untersuchten Kontrollen. Eine in 6 Fällen durchgeführte antibiotische Therapie führte in allen Fällen zu einem rückläufigen LTT. Da der LTT auf das Mitogen Phytohämagglutinin oder Tetanus-Antigen nicht abfiel, schlossen die Autoren aus, dass der Rückgang im Borrelien-LTT lediglich auf eine global veränderte Reaktionsbereitschaft der T-Lymphozyten zurückzuführen ist.<sup>9</sup>

An der Universität Würzburg wurde der LTT bei 55 Patienten mit gesicherter Lyme Arthritis (LA) und 48 Gesunden durchgeführt. Die Patienten mit LA hatten deutlich höhere LTT-Ergebnisse als die Gesunden. Die verwendete LTT-Methode zeigte eine Spezifität von 78 % bei einer Sensitivität von 77 %.<sup>10</sup> Anzumerken ist, dass im Unterschied zu allen anderen Studien der LTT nach antibiotischer Therapie in vielen Fällen nicht abgefallen ist. Die möglichen methodischen oder medikamentösen Ursachen (Substanzklasse des Antibiotikums?) wurden leider nicht diskutiert. Ebenfalls in Würzburg wurde der LTT bei 11 Kindern mit LA und 5 Kontrollen angewendet. Bei den 5 Kontrollpersonen handelte es sich um Patienten, bei denen die LA behandelt war und die zum Untersuchungszeitpunkt keine Symptome mehr zeigten. Bei Patienten mit LA zeigten sich deutlich positivere Ergebnisse im LTT, auch wenn aufgrund der nur 5 Kontrollen keine Signifikanz berechnet wurde. Parallele flowzytometrische Analysen zeigten, dass hauptsächlich CD4-Lymphozyten und keine B-Lymphozyten im LTT reagierten, was für eine spezifische T-Zellstimulation und gegen einen unspezifischen (mitogenen) Effekt spricht.<sup>11</sup>

In zwei weiteren Publikationen legen das Institut für Medizinische Diagnostik Berlin (IMD) und das Medizinische Labor Bremen als nach DIN 15189 akkreditierte Labore ihre Validierungsdaten offen, die an größeren Kohorten von Patienten mit LB und Gesunden erhoben wurden. In Bremen wurde die Spezifität mit 96,7 % angegeben. Zudem wurde der LTT bei 87 % der antibiotisch Behandelten zum zweiten Untersuchungszeitpunkt negativ. Die Verminderung der Lymphozytenreaktivität korrelierte zur Reduktion der klinischen Symptomatik.<sup>12</sup> Mit der am IMD Berlin verwendeten LTT-Methodik zeigten nur 2 der 160 Kontrollprobanden ein positives Ergebnis, was einer hohen Spezifität von 98,7 % entspricht. Zur Prüfung der Sensitivität wurden 94 Borreliose-Patienten vor antibiotischer Behandlung untersucht. 84 waren positiv im LTT, was einer Sensitivität von 89,4 % entspricht.

Nach antibiotischer Therapie zeigten 92 % der Frühphase-Patienten und 53 % der Patienten aus der Gruppe mit späten Formen eine Negativierung ihres LTT, was bestätigt, dass ein positives LTT-Ergebnis tatsächlich mit der Aktivität der Erkrankung assoziiert ist.<sup>13</sup>

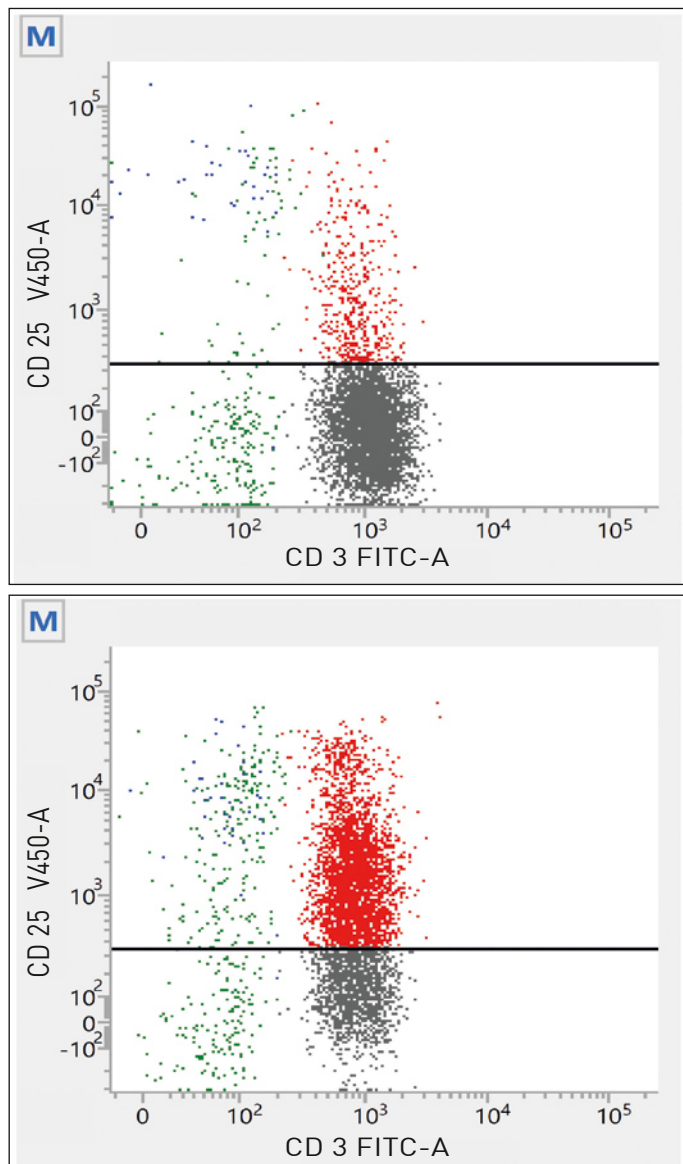


Abb. 5: Mit zytofluorometrischen Analysen kann heute sicher nachgewiesen werden, ob eine im LTT nachweisbare T-Zellantwort spezifisch oder unspezifisch ist.

Nicht weniger als 10 Publikationen zeigen, dass mit dem LTT eine Differenzierung zwischen aktiver und ausgeheilter Borreliose bzw. Gesunden möglich ist. In 6 dieser Studien wurde der LTT nach Antibiose wiederholt. Die Stimulationsindizes fielen dabei in 5 Studien signifikant ab (Ausnahme Huppertz et al. 1996, siehe oben<sup>10</sup>). Hinsichtlich der Eignung des LTT zur Differenzierung zwischen aktiver und ausgeheilter Borreliose kommt lediglich ein Autor zu einer negativen Beurteilung des LTT. In dieser 1991 publizierten Studie wurden aber lediglich 12 Patienten mit LB und 12 Gesunde untersucht.<sup>14</sup> Der LTT war bei 11 Patienten aber auch bei 8 Kontrollen auffällig. Auch wenn der LTT bei Patienten mit LB signifikant höher im Vergleich zu gesunden Kontrollen war, folgern die Autoren, dass der LTT „häufig“ falsch positiv ist. Das

ist aber eine Aussage, die angesichts der geringen Probandenzahl nicht haltbar ist. Trotzdem wird diese Arbeit heute gern von Kritikern des LTT zitiert, um die von ihnen postulierte schlechte Spezifität des LTT zu belegen. Abgesehen davon, dass die 10 zu einer positiven Bewertung kommenden Studien unberücksichtigt bleiben, ist eine so weitreichende Schlussfolgerung bei einer so geringen Probandenzahl nicht vertretbar.

In Kenntnis der 1991 noch fehlenden Möglichkeiten der Reinigung von Borrelienantigenen bzw. deren rekombinanter Herstellung sind die falsch-positiven Ergebnisse wohl eher in den damaligen methodischen Unzulänglichkeiten begründet.

#### Die Bewertung des LTT in der AWMF-Leitlinie

In der AWMF-S3-Leitlinie „Neuroborreliose“ wird dem LTT wegen angeblich schlechter Spezifität eine diagnostische Bedeutung abgesprochen. Die dabei zitierten Quellen sind aber nicht die hier zitierten Studien, sondern lediglich unbegründete Meinungsäußerungen, bei denen sich die Autoren meist untereinander zitieren, ohne eigene oder fremde Daten zu nennen. Das darf aber doch nicht die Grundlage dafür sein, dass der LTT als „nicht validiert“ in den derzeit gültigen Leitlinien (LL) zur kutanen Borreliose und zur Neuroborreliose abqualifiziert wird, wenn 10 von 11 Studien seine gute Aussagefähigkeit belegen und die Daten zur Spezifität und Sensitivität der „in-house“-entwickelten LTTs in Bremen und Berlin bei über 90 % liegen. Eine der Folgen dieser Fehlbeurteilung ist, dass der LTT seit 2007 nicht mehr von den gesetzlichen Krankenkassen bezahlt wird, was für die betroffenen Patienten eine große finanzielle Bürde bedeutet.

Das Gesamtresümee aller Studien zum LTT ist ohne Zweifel positiv, obwohl viele zu Zeiten durchgeführt wurden, als die Qualität der Testantigene und die Zellkulturbedingungen deutlich schlechter waren als heute. Die weit überwiegende Zahl der Studien bescheinigt dem LTT eine Wertigkeit in der Diagnostik sowie bei der Therapiekontrolle, denn bis auf eine Arbeit zeigen alle einen Rückgang der Stimulationsindizes nach antibiotischer Behandlung. Das ist ein wesentlicher Unterschied zum Elispot.

#### Der Elispot ist eine Innovation – aber leider nicht geeignet zum Nachweis einer aktiven Borreliose

1995 wurde erstmals die damals neue Elispot-Technologie mit Borrelienantigenen vorgestellt.<sup>15</sup> Bis heute sind nach unserer Kenntnis zum Elispot-Test bei Borreliose 9 Patientenstudien publiziert, die im Wesentlichen aussagen, dass der Test zwar einen stattgefundenen Kontakt mit Borrelien, d. h. eine Gedächtniszellantwort mit hoher Sensitivität nachweist, aber keine Differenzierung zwischen aktiver Borreliose und ausgeheilter Erkrankung erlaubt. Demzufolge ist er nicht zur Bestätigung einer Behandlungsbedürftigkeit oder zur Therapiekontrolle nach Antibiose geeignet. So zeigte sich im Elispot kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit Lyme-Borreliose und seropositiven gesunden Personen.<sup>16</sup> In einer weiteren Studie waren auch 9 von 17 gesunden seropositiven Patienten positiv im Elispot.<sup>17</sup>

In einer 2012 veröffentlichten Studie fand man keinen Unterschied beim IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-17 im Elispot zwischen gesunden seropositiven Kindern, Kindern mit durchgemachter LB und gesunden seronegativen Probanden.<sup>18</sup> Eine Gruppe mit aktiver Erkrankung wurde leider nicht vergleichend untersucht.

Widhe zeigte mit dem Borrelien-Elispot zwar im Liquor, aber nicht im Blut von Patienten mit Neuroborreliose signifikant erhöhte Frequenzen von IFN- $\gamma$  und IL-4 sezernierenden T-Lymphozyten.<sup>19</sup>

In einer anderen Studie fand man die höchsten IFN- $\gamma$ -Werte im Elispot in der Patientengruppe mit Neuroborreliose, konnte aber zwischen Patienten mit Neuroborreliose und Kontrollpatienten mit ähnlicher neurologischer Symptomatik bei anderen Diagnosen keine signifikanten Unterschiede finden.<sup>20</sup> Die Autoren resümieren, dass eine Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Sekretion auch durch andere proentzündliche Geschehen induziert werden kann.

Der Vergleich der Elispot-Ergebnisse zwischen 27 Patienten mit Fibromyalgie und 26 gesunden Kontrollen zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen, sodass der Elispot zumindest keinen Beweis für einen Zusammenhang zwischen Fibromyalgie und Borrelien-spezifischen T-Lymphozyten erbringen konnte.<sup>21</sup>

In einer dänischen Studie zeigten sich beim Elispot keine signifikanten Unterschiede zwischen 14 Patienten mit akuter Neuroborreliose und 103 Kontrollen. Der Elispot erreichte hier nur eine Sensitivität von 36 % bei einer Spezifität von 82 %.<sup>22</sup>

In einer weiteren Studie wurden 18 aktive und 12 behandelte Neuroborreliose-Patienten, 10 gesunde Personen, die wegen einer frühen (meist kutanen) Borreliose-Manifestation in der Vergangenheit behandelt worden waren, und 47 gesunde Personen untersucht. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass der Elispot nur Sensitivitäten zwischen 50 % und 66,7 % und Spezifitäten zwischen 42 und 59,4 zeigt. Das Resümee der Studie war, dass der Elispot nicht in der Lage ist, eine aktive Lyme-Neuroborreliose zu diagnostizieren oder den Erfolg einer antibiotischen Behandlung zu belegen.<sup>23</sup>

Dieselbe Forschergruppe verglich die Elispot-Ergebnisse von 145 gesunden Personen mit denen von 33 aktiven und 37 behandelten Neuroborreliose-Patienten und 28 gesunden Personen, die in der Vergangenheit wegen einer Frühmanifestation der Borreliose behandelt wurden. Die Elispot-Ergebnisse waren zwar bei Gesunden signifikant niedriger, unterschieden sich aber nicht zwischen aktiven und behandelten Neuroborreliose-Patienten sowie Gesunden, die in der Vergangenheit wegen Borreliose behandelt wurden. Das Resümee war, dass man mit dem Elispot zwar einen stattgefundenen Borrelienkontakt nachweisen kann, dieser Test aber nicht geeignet ist, eine aktive Neuroborreliose zu erkennen.<sup>24</sup>

### Warum wird der LTT unter Therapie negativ?

Wie erklärt sich, dass der Elispot auch bei erfolgreich behandelter ausgeheilter Borreliose positiv bleibt, der LTT aber unter die Nachweisgrenze fällt. Diese Frage ist nicht abschließend zu beantworten. Eine Erklärung ist, dass die beim Elispot gemessenen Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  in der Aktivierungskaskade von spezifischen T-Zellen viel früher und durch deutlich weniger Reize stimulierbar sind, als die finale Zellteilung, die beim LTT erfasst wird. Das erklärt, warum der LTT schwache (falsch positive) T-Zellaktivierungen „verzeiht“ und sie in der Entwicklungsphase der 5-tägigen Zellkultur wieder negativ werden lässt. Eine andere Erklärung ist, dass IFN- $\gamma$  nicht nur durch Borrelien-spezifische Effektor-T-Zellen sezerniert wird, sondern auch durch Natürliche

Killerzellen und in geringer Menge durch CD4-Gedächtniszellen, die auch Jahre nach Therapie noch vorhanden sind. Da NK-Zellen und auch die CD4-Gedächtniszellen zwar Zytokine sezernieren, die Zellen in vitro aber kaum proliferieren, könnte dies erklären, warum der LTT unter Therapie negativ wird, der Elispot aber in allen publizierten Studien positiv bleibt.

### Ist der Elispot mit zusätzlichem IL-2-Nachweis eine Verbesserung?

Zu dieser Frage gibt es für Borrelien noch keine publizierten Daten. Aus unserer Sicht kann die zusätzliche Erfassung von IL-2 allenfalls die Sensitivität hinsichtlich des Nachweises einer Gedächtniszellreaktion erhöhen, weil IL-2 nicht nur von Effektorzellen sondern auch von aktivierten Gedächtniszellen freigesetzt wird. Diese Erhöhung der Sensitivität ist sinnvoll beim Elispot auf Tuberkulose-Mykobakterien, weil man hier mit maximaler Sensitivität auch die alte, latente Infektion erkennen möchte. Bei chronischer Borreliose, wo die zelluläre Diagnostik aber die aktuelle Aktivität widerspiegeln soll, ergibt sich kein Vorteil. Es gibt also aktuell keine Hinweise dafür, dass das IL-2 zur Differenzierung zwischen Gedächtniszellantwort und Effektorzellantwort beiträgt, also zur Klärung der Frage, ob eine behandlungsbedürftige aktive Infektion vorliegt oder nicht.

### Wie ist der Elispot bei anderen Bakterien und Viren einzuschätzen?

Die Elispot-Technologie ist eine vielversprechende Methode, wenn man mit hoher Sensitivität Gedächtniszellen im Blut nachweisen möchte, egal ob die Erkrankung zum Untersuchungszeitpunkt aktiv ist oder nicht. Aus diesem Grund ist der Elispot aus der Diagnostik der latenten Tuberkulose nicht mehr wegzudenken. Eine mögliche Anwendung könnte auch der Nachweis von Reaktivierungen von Herpesvirus-Infektionen oder von Epstein-Barr-Virus- und Cytomegalievirus-Infektionen sein. Hierbei handelt es sich um obligat persistierende Viren, d.h. das Immunsystem des Organismus muss diese Viren lebenslang nach Primärinfektion kontrollieren. Die Hoffnung liegt darin, dass über ein breites Spektrum an T-Zellzytokinen einschließlich IL-2, IL-4, IL-23 oder IL-17 und deren quantitativen Relationen zueinander auf die Virus-spezifische Immunität und das Aktivitätsstadium geschlossen werden kann. Auch in der Allergiediagnostik könnte der Elispot an Bedeutung gewinnen, z.B. bei Allergien auf Medikamente oder seltene Berufsallergene. Entsprechende Studien laufen derzeit am IMD Berlin.

### Zusammenfassung

Es ist Konsens nahezu aller Studien, dass für die Diagnose der Borreliose die Anamnese und die Klinik das Primat haben. An zweiter Stelle steht die Bestimmung borrelienspezifischer Antikörper im Blut bzw. bei Verdacht auf Neuroborreliose im Liquor, wobei ein fehlender Antikörpertiter eine Borreliose nicht ausschließen kann. Bei klinisch unklaren Fällen einer chronischen Borreliose steht mit dem Borrelien-LTT eine Methode zur Verfügung, die zur Klärung hinsichtlich Krankheitsaktivität, Behandlungsindikation und Therapieerfolg beiträgt. Auch wenn neuere Patientenstudien wünschenswert wären, ist die vorliegende wissenschaftliche Literatur ausreichend, um den LTT auf Borrelienantigene als Baustein in der Diagnostik der aktiven Borreliose zu rechtfertigen.

Der Elispot ist geeignet, eine zurückliegende Infektion nachzuweisen. Eine gewisse Aussage ist damit auch in der Borreliose-diagnostik zu treffen, z. B. um die Frage zu beantworten, ob eine Reaktivierung prinzipiell möglich wäre. Er kann aber nicht dazu dienen, die Indikation für eine antibiotische Therapie zu stellen, da im Elispot nicht zwischen aktiver und ausgeheilter Borreliose unterschieden werden kann. Keinesfalls sollte aus einem nach Therapie fortbestehend positiven Elispot darauf geschlossen werden, dass weiterhin Aktivität besteht und weiter antibiotisch therapiert werden muss. Diese studiengesicherte Datenlage zu

den Grenzen des Elispots sollte in den Befunden der Labore klarer zum Ausdruck kommen, um unnötige lange Antibiotikatherapien zu vermeiden.

#### Korrespondenzadresse:

Dr. med. Petra Hopf-Seidel, Fachärztin für Neurologie  
Heidingsfelder Weg 32, 91522 Ansbach

Dr. Volker von Baehr, Facharzt für Laboratoriumsmedizin  
Institut für Medizinische Diagnostik Berlin  
Nicolaistraße 22, 12247 Berlin

#### Literatur

- 1 von Baehr V, Mayer W, Liebenthal C, von Baehr R, Bieger W, Volk HD (2001): Improving the in vitro antigen-specific T-cell proliferation assay: the use of interferon-alpha to elicit antigen specific stimulation and decrease by standard proliferation J Immunol Methods. 251:63-71
- 2 Dattwyler RJ, Thomas JA, Benach JL, Golightly MG (1986): Cellular immune response in Lyme disease: the response to mitogens, live *Borrelia burgdorferi*, NK cell function and lymphocyte subsets. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg. 263:151-9
- 3 Sigal LH, Steere AC, Freeman DH, Dwyer JM (1986): Proliferative responses of mononuclear cells in Lyme disease. Reactivity to *Borrelia burgdorferi* antigens is greater in joint fluid than in blood. Arthritis Rheum. 29:761-9
- 4 Dattwyler RJ, Volkman DJ, Luft BJ, Halperin JJ, Thomas J, Golightly MG (1988): Seronegative Lyme disease. Dissociation of specific T- and B-lymphocyte responses to *Borrelia burgdorferi*. N Engl J Med. 319:1441-6
- 5 Dressler F, Yoshinari NH, A C Steere (1991): The T-cell proliferative assay in the diagnosis of Lyme disease. Ann Intern Med. 115:533-9
- 6 Krause A, Brade V, Schoerner C, Solbach W, Kalden JR, Burmester GR (1991): T-cell proliferation induced by *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. Autologous serum required for optimum stimulation. Arthritis Rheum. 34:393-402
- 7 Schempp C, Owsianowski M, Lange R, Gollnick H (1993): Comparison of *Borrelia burgdorferi* ultrasonicate and whole *B. burgdorferi* cells as a stimulus for T-cell proliferation and GM-CSF secretion in vitro. Zentralbl Bakteriol. 279:417-25
- 8 Buechner SA et al. (1995): Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in patients with erythema migrans, acrodermatitis chronica atrophicans, lymphadenitis benigna cutis and morphea. Arch Dermatol; 131:673-7
- 9 Breier P, Klade H, Stanek G, Poitschek C, Kimbaurer R, Dorda W, Aberer E (1996): Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in circumscribed scleroderma. Brit J Dermatol. 134:285-91
- 10 Huppertz HI, Mösbauer S, Busch DH, Karch H (1996): Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in the diagnosis of Lyme arthritis in children and adolescents. Eur J Pediatr. 155:297-302
- 11 Rutkowski S, Busch DH, Huppertz HI (1997): Lymphocyte proliferation assay in response to *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme arthritis: analysis of lymphocyte subsets. Rheumatol Int; 17:151-8
- 12 Valentine-Thon E, Ilsemann K, Sandkamp MA (2007): novel lymphocyte transformation test (LTT-MELISA®) for Lyme borreliosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 57:27-34
- 13 von Baehr V, Doebe C, Volk HD, von Baehr R (2012): The lymphocyte transformation test for borrelia detects active Lyme borreliosis and verifies effective antibiotic treatment. Open Neurol J.; 6: 104-12
- 14 Zoschke DC, Skemp AA, Defosse DL (1991): Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease. Ann Intern Med. 17:151-158
- 15 Forsberg P, Ernerudh J, Ekerfelt C, Roberg M, Vrethem M, Bergström S (1995): The outer surface proteins of Lyme disease *Borrelia burgdorferi* stimulate T-cells to secrete interferon-gamma (IFN-gamma): diagnostic and pathogenic implications Clin Exp Immunol. 101:453-60
- 16 Ekerfelt C, Forsberg P, Svenvik M, Roberg M, Bergström S, Ernerudh J (1999): Asymptomatic *Borrelia*-seropositive individuals display the same incidence of *Borrelia*-specific interferon-gamma (IFN-gamma)-secreting cells in blood as patients with clinical *Borrelia* infection. Clin Exp Immunol. 115: 498-502
- 17 Ekerfelt C, Masreliez C, Svenvik M, Ernerudh J, Roberg M, Forsberg P (2001): Antibodies and T-cell reactivity to *Borrelia burgdorferi* in an asymptomatic population: a study of healthy blood donors in an inland town district in the south-east of Sweden. Scand J Infect Dis. 33:806-8
- 18 Skogman BH, Hellberg S, Ekerfelt C, Jenmalm MC, Forsberg P, Ludvigsson J, Bergström S, Ernerudh J (2012): Adaptive and innate immune responsiveness to *Borrelia burgdorferi* *sensu lato* in exposed asymptomatic children and children with previous clinical Lyme borreliosis. Clin Dev Immunol. 294587. doi: 10.1155/2012/294587
- 19 Widhe M, Skogman BH, Jarefors S, Ekerfelt M, Eneström G, Nordwall M, Ekerfelt C, Croner G, Bergström S, Forsberg P, Ernerudh J (2005): Up-regulation of *Borrelia*-specific IL-4- and IFN-gamma-secreting cells in cerebrospinal fluid from children with Lyme neuroborreliosis. Int Immunol. 17:1283-91
- 20 Vrethem M, Widhe M, Ernerudh J, Garpmo U, Forsberg P (2011): Clinical, diagnostic and immunological characteristics of patients with possible neuroborreliosis without intrathecal Ig-synthesis against *Borrelia* antigen in the cerebrospinal fluid. Neurol Int. e2. doi: 10.4081/ni.2011.e2
- 21 Puri BK, Lee GS, Schwarzbach A (2022): Is Fibromyalgia Associated with *Borrelia*-specific T Lymphocytes? Curr Rheumatol Rev;18:157-159
- 22 Nordberg M, Forsberg P, Nyman D, Skogman BH, Nyberg C, Ernerudh J, Eliasson I, Ekerfelt C (2012): Can ELISPOT Be Applied to A Clinical Setting as A Diagnostic Utility for Neuroborreliosis? Cells. 8(1): 153-67
- 23 van Gorkom T, Voet W, Sankatsing SU, Nijhuis CD, TerHaak E, Kremer K, Thijsen SF (2020): Prospective comparison of two enzyme-linked immunosorbent spot assays for the diagnosis of Lyme neuroborreliosis. Clin Exp Immunol; 199:337-356
- 24 van Gorkom T, Sankatsing SU, Voet W, Ismail DM, Mulwijk RH, Salomons M, Vlamincx BJ, Bossink AW, Notermans DW, Bouwman JJ, Kremer K, Thijsen SF (2018): An Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay Measuring *Borrelia burgdorferi* B31-Specific Interferon Gamma-Secreting T-Cells Cannot Discriminate Active Lyme Neuroborreliosis from Past Lyme Borreliosis: a Prospective Study in the Netherlands. J Clin Microbiol. 26;56:e01695-17.
- 25 Puri BK, Lee GS, Schwarzbach A (2022): Is Fibromyalgia Associated with *Borrelia*-specific T- Lymphocytes? Curr Rheumatol Rev;18:157-159