



Zellulär immunologische Methoden zur Verlaufsbeobachtung von Patienten mit Borreliose vor und nach antibiotischer Therapie

Prof. Dr. med. Rüdiger von Baehr

Institut für medizinische Diagnostik-Berlin

Jahrestagung der Deutschen Borreliosegesellschaft e.V.

20. - 22..03.2009 in Tabarz



Im Gegensatz zum Nachweis spezifischer Antikörper (Serologie) spielten zellulär immunologische Methoden bisher in der Diagnostik oder Verlaufsbeobachtung von Infektionserkrankungen nahezu keine Rolle.

Erster Durchbruch: Quantiferon-TB-Test (für Tuberkulose)

Weitere Einsatzgebiete für zellulär immunologische Methoden sind Probleminfektionen wie obligat und potentiell persistierende Infektionen.

Obligat latent persistierend : Latente Virusinfektionen (Herpesviren)

Toxoplasmose, Tuberkulose

Serologie positiv, LTT i.d.R. schwach positiv

Potentiell persistierende Erreger: *Borrelien, Yersinien, Chlamydien*

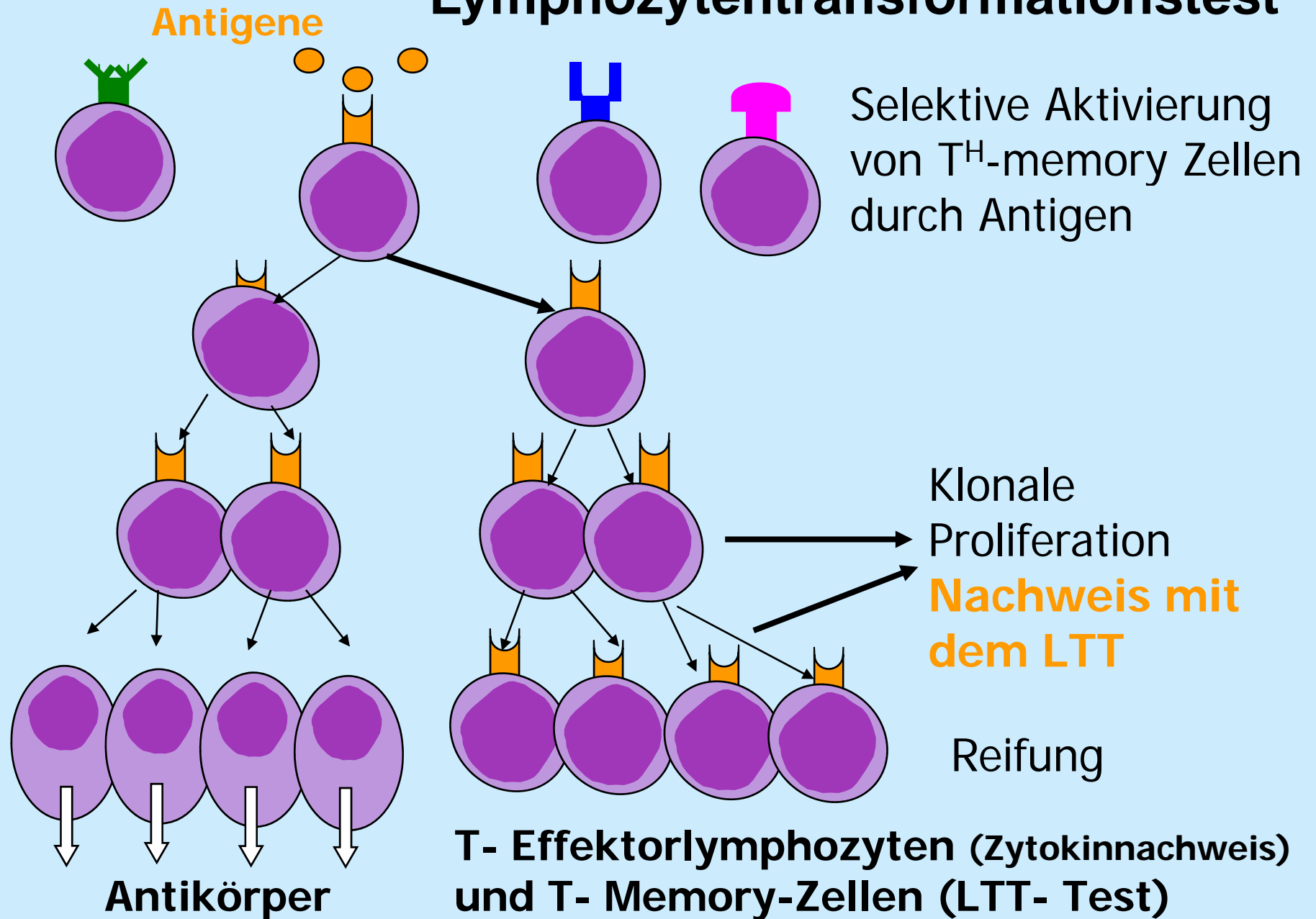
Fragestellung bei positiver Serologie: Floride Infektion ??



Die klassische zellulär immunologische Methode ist seit 40 Jahren der Lymphozytentransformations-(LTT) bzw. Lymphozytenproliferationstest.



Lymphozytentransformationstest





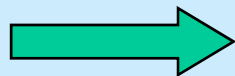
LTT- Borrelien

(Lymphozytentransformationstest- Borrelien)

Testprinzip: 6 tägige Inkubation von Immunzellen aus dem Blut des Patienten mit Borrelienantigenen

1. Rekombinantes OspC von Borrelia afzelii
2. Borrelia afzelii-Lysat
3. Borrelia sensu stricto-Lysat
4. Borrelia garinii- Lysat

Frage: Befinden sich Borrelien-spezifische memory-T-Zellen im Patientenblut ?



Ein positiver LTT- Borrelien sagt aus:
Es sind Borrelien- spezifische T- memory-Zellen im Blut vorhanden.



Der Lymphozytentransformationstest (LTT)

1. Gewinnung der Lymphozyten und Monozyten aus Heparinblut durch Dichtegradientenzentrifugation

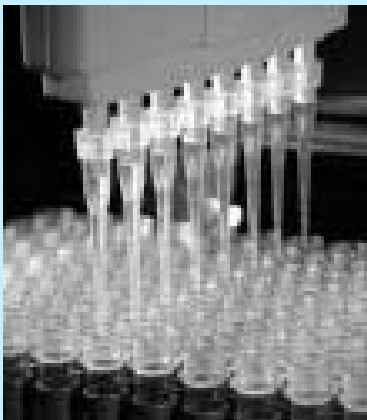


- ← Serum
- ← Lympho-/Monozyten
- ← Erythro- und Granulozyten

2. Überführung von 2×10^5 /ml vitalen Zellen in ein Zellkulturwell (3fach-Ansatz)



3. Zugabe von Borrelienantigenen (z.B. OspC)



4. Inkubation über 6 Tage bei 37°C, 5 %CO₂

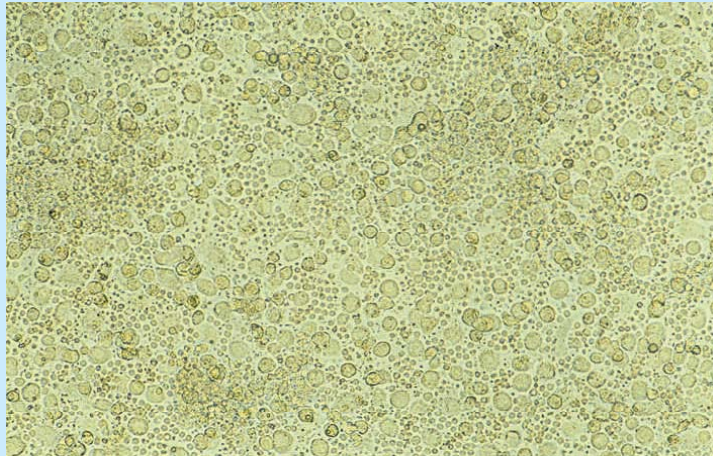


Tag 0 „ruhende T-Zellen“

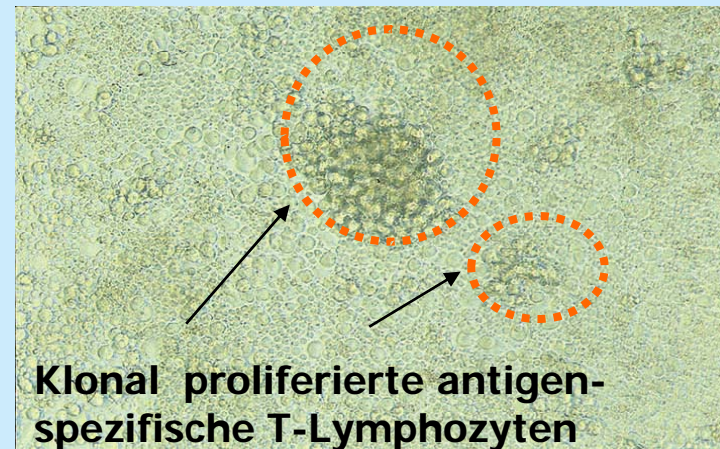


Ergebnis nach 6 Tagen

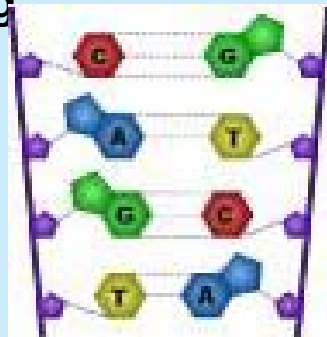
Negatives Ergebnis



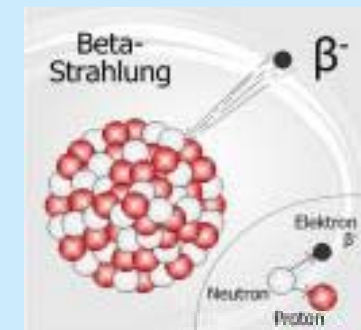
Positives Ergebnis



5. Quantifizierung der antigeninduzierten DNA-Neusynthese durch Bestimmung des ^3H -Thymidin-Einbaus während 12 h am 6.Tag



6. Messung des eingebauten ^3H -Thymidin mit automatischem Beta-Counter



7. Resultat als
 $\text{SI} = \frac{\text{Antigen-induzierter } T^* \text{-Einbau}}{\text{Leerwert-} T^* \text{-Einbau}}$



Vielen Dank für Ihre Überweisung.
Wir haben folgenden Befund erhoben:

Ärztlicher Befundbericht

Patient	Tagebuch-Nr.	Geburtsdatum	Versicherung	Kasse
	2529422		Kennziffer OIII	3481
Eingang	26.02.04	Ausgang	03.03.04	

Untersuchung/Material: "Lymphozytentransformationstest Profil - LTT-Borrelien (Heparinblut)

Testansätze - Borrelienantigene

	SI
B. garinii	1,2
B. afzelii	1,2
B. sensu strictu	1,3
OspC-Antigen	1,2
Positivkontrollen	
PPD (Antigen)	15,7
PWM (Mitogen)	43,4
Leerwert (Negativkontrolle)	1331 Normalwert: < 3000 cpm

Erläuterungen:

Die Zahlen rechts neben der Balkengraphik sind die Stimulationsindizes (SI) für das jeweilige **Borrelien-antigen**, das den Patientenzellen zugesetzt wurde (Mittelwert von 3-fach-Ansätzen).

Der Stimulationsindex ist der Quotient aus der Antigen-induzierten- und der unstimulierten Thymidineinbaurate (Leerwert in cpm, angegeben ist der Mittelwert von 3 Paralleluntersuchungen). Ein SI > 3 bedeutet eine mehr als dreifache zelluläre Aktivierung durch das Antigen im Vergleich zum Leerwert und beweist die Existenz von zirkulierenden Borrelien-spezifischen T-Zellen im Patientenblut (positives Ergebnis). Ein SI < 2 gilt als sicher negativ. Ergebnisse zwischen 2 und 3 sind als grenzwertig anzusehen (schwache bzw. fragliche Sensibilisierung), die ggf. kontrolliert werden sollten.

Die **Positivkontrollen** dienen ausschließlich dem Nachweis der Reaktionsfähigkeit der Lymphozyten. Hier wird PPD -Antigen als "Recall-Antigen" verwendet, bei dem eine T-zelluläre Sensibilisierung nahezu immer vorhanden ist. PWM ist als Mitogen ein Indikator für die Vitalität der Immunzellen bei Probeneingang im Labor.

Stimulationsindizes von > 8 bei der Mitogenkontrolle PWM und > 3 bei der Antigenkontrolle PPD sichern die Auswertbarkeit der Untersuchung.

Befund:

Der Befund zeigt keinen Nachweis von Borrelien-spezifischen T-Helferzellen im Patientenblut. Alle drei getesteten Borreliensatantigene und das spezies-übergreifende OspC sind negativ.

Dieser Befund spricht gegen eine zur Zeit aktive Borrelieninfektion, da keine Borrelien-spezifischen Zellen im Blut vorhanden sind, die auf einen aktiven Immunprozess hindeuten würden.



Ärztlicher Befundbericht

Vielen Dank für Ihre Überweisung.
Wir haben folgenden Befund erhoben:

Patient	Tagebuch-Nr.	Geburtsdatum	Versicherung	Kasse
[REDACTED]	2529122	[REDACTED]	Kennziffer OIII	3481
Eingang	27.02.04	Ausgang	04.03.04	

Untersuchung/Material: "Lymphozytentransformationstest Profil - LTT-Borrelien (Heparinblut)

Testansätze - Borrelienantigene

	SI
B. garinii	9,6
B.afzelii	8,9
B.sensu strictu	8,3
OspC-Antigen	10,0
Positivkontrollen	
PPD (Antigen)	11,3
PWM (Mitogen)	42,6
Leerwert (Negativkontrolle)	1383 Normalwert: < 3000 cpm

Erläuterungen:

Die Zahlen rechts neben der Balkengraphik sind die Stimulationsindizes (SI) für das jeweilige **Borrelien-antigen**, das den Patientenzellen zugesetzt wurde (Mittelwert von 3-fach-Ansätzen). Der Stimulationsindex ist der Quotient aus der Antigen-induzierten- und der unstimulierten Thymidineinbaurate (Leerwert in cpm, angegeben ist der Mittelwert von 3 Paralleluntersuchungen). Ein SI > 3 bedeutet eine mehr als dreifache zelluläre Aktivierung durch das Antigen im Vergleich zum Leerwert und beweist die Existenz von zirkulierenden Borrelien-spezifischen T-Zellen im Patientenblut (positives Ergebnis). Ein SI < 2 gilt als sicher negativ. Ergebnisse zwischen 2 und 3 sind als grenzwertig anzusehen (schwache bzw. fragliche Sensibilisierung), die ggf. kontrolliert werden sollten.

Die **Positivkontrollen** dienen ausschließlich dem Nachweis der Reaktionsfähigkeit der Lymphozyten. Hier wird PPD -Antigen als "Recall-Antigen" verwendet, bei dem eine T-zelluläre Sensibilisierung nahezu immer vorhanden ist. PWM ist als Mitogen ein Indikator für die Vitalität der Immunzellen bei Probeneingang im Labor.

Stimulationsindizes von > 8 bei der Mitogenkontrolle PWM und > 3 bei der Antigenkontrolle PPD sichern die Auswertbarkeit der Untersuchung.

Befund:

.Es zeigen sich positive Reaktionen auf 3 Borrelienantigene. Der Befund ist sehr verdächtig für eine derzeit mäßig aktive Borrelieninfektion. Die Serologie weist spezifische IgG-und IGM-Antikörper für Borrelien aus und bestärkt damit den Verdacht. Für die Therapieindikation sind jedoch besonders die Klinik und die Anamnese entscheidend. Sollte behandelt werden, ist eine Kontrolluntersuchung vier bis sechs Wochen nach Beendigung der Therapie zu empfehlen. Nach erfolgreicher Behandlung sind die positiven Reaktionen deutlich rückläufig bis nicht mehr vorhanden zu erwarten.



Vielen Dank für Ihre Überweisung.
Wir haben folgenden Befund erhoben:

Ärztlicher Befundbericht

Patient	Tagebuch-Nr.	Geburtsdatum	Versicherung	Kasse
[Redacted]	2523233	[Redacted]	Kennziffer OIII	
Eingang	16.01.04	Ausgang	26.01.04	

Untersuchung/Material: **"Lymphozytentransformationstest Profil - LTT-Borrelien"** (Heparinblut)

Testansätze - Borrelienantigene

Antigen	SI
B. garinii	7,5
B. afzelii	2,8
B. sensu strictu	2,5
OspC-Antigen	8,1
Positivkontrollen	
PPD (Antigen)	12,5
PWM (Mitogen)	45,3
Leerwert (Negativkontrolle)	1299 Normalwert: < 3000 cpm

Erläuterungen:

Die Zahlen rechts neben der Balkengraphik sind die Stimulationsindizes (SI) für das jeweilige **Borrelienantigen**, das den Patientenzellen zugesetzt wurde (Mittelwert von 3-fach-Ansätzen).

Der Stimulationsindex ist der Quotient aus der Antigen-induzierten- und der unstimulierten Thymidineinbaurate (Leerwert in cpm, angegeben ist der Mittelwert von 3 Paralleluntersuchungen). Ein SI > 3 bedeutet eine mehr als dreifache zelluläre Aktivierung durch das Antigen im Vergleich zum Leerwert und beweist die Existenz von zirkulierenden Borrelien-spezifischen T-Zellen im Patientenblut (positives Ergebnis). Ein SI < 2 gilt als sicher negativ. Ergebnisse zwischen 2 und 3 sind als grenzwertig anzusehen (schwache bzw. fragliche Sensibilisierung), die ggf. kontrolliert werden sollten.

Die **Positivkontrollen** dienen ausschließlich dem Nachweis der Reaktionsfähigkeit der Lymphozyten. Hier wird PPD -Antigen als "Recall-Antigen" verwendet, bei dem eine T-zelluläre Sensibilisierung nahezu immer vorhanden ist. PWM ist als Mitogen ein Indikator für die Vitalität der Immunzellen bei Probeneingang im Labor.

Stimulationsindizes von > 8 bei der Mitogenkontrolle PWM und > 3 bei der Antigenkontrolle PPD sichern die Auswertbarkeit der Untersuchung.



Validierung des LTT- Borrelien

(Stand 12/2008)

- **klinisch Gesunde – seronegativ (n = 160)**
 - LTT negativ (SI < 2) = 144 (90,0%)
 - LTT grenzwertig (SI > 2 < 3) = 14 (8,7%)
 - LTT positiv (SI > 3 < 5) = 2 (1,3%)
- **klinisch Gesunde - seropositiv (n = 48)**
(Land- und Forstarbeiter, Jäger, Gärtner, Hundehalter)
 - LTT negativ = 35 (72,9 %)
 - LTT grenzwertig = 9 (18,7 %)
 - LTT positiv (SI > 3 < 5) = 4 (8,4 %)
- **klinisch Borreliose – seropositiv (n = 94)**
(vor antibiotischer Behandlung)
 - LTT negativ = 7 (7,4 %)
 - LTT grenzwertig = 3 (3,2 %)
 - LTT positiv = 84 (89,4 %)

Spezifität 94%

Sensitivität ~ 90%



Eine neue Methode sollte immer auf ihre Korrelation mit einer bekannten validierten Methode untersucht werden.



Borrelien- Serologie und LTT- Borrelien

- **n = 1480 (100 %)**
- **Serologie und LTT positiv : 560 (37,8 %)**
- **Serologie und LTT negativ: 622 (42,0 %)**
- **Übereinstimmung Serologie und LTT: 79,8 %**
- **Serologie positiv; LTT negativ: 266 (18,0 %)**
- **Serologie negativ; LTT positiv : 32 (2,2 %)**

Serologie: recomWell-Borrelia (IgG-, IgM- EIA)
recomBlot- Borrelia (IgG-, IgM- Blot)

LTT- Borrelien mit rekomb.OspC und Lysatantigenen von
Borr.sensu stricto, afzelii, garinii (Seramun)



Borrelien-Serologie positiv LTT negativ

n = 266 Patienten

Davon:

240 (90,2%) nach antibiot. Therapie (klin. o.B.)

15 (5,7%) mit Rheumatoidarthritis

5 (1,9%) nach infekt. Mononukleose (EBV)

3 (1,1%) reaktive Arthritis

3 (1,1%) nicht zu klären



Borrelien- Serologie negativ LTT- positiv

n = 32

davon:

16 Erythema migrans

**12 mit positivem Borr. EIA- Suchtest
keine spezifischen Banden im Blot**

4 unklar (Serologie völlig unauffällig)



Kasuistik :

53 j. Frau seit 3 Tagen fragliches E. migrans am re. Unterschenkel, grippeartiges Krankheitsgefühl, kein Zeckenstich wahrgenommen

Serologie: IgG-Borrelien-EIA negativ
 IgM-Borrelien-EIA positiv
 IgG-Immunoblot negativ
 IgM-Immunoblot negativ (nur p41 stark positiv)

LTT-Borrelien: B. sensu stricto SI **7,9**
 B. afzelii **9,1**
 B. garinii **5,4**
 OspC **1,8**

PCR-Borrelien (OspA-Gen) im Blut **positiv**



Fazit:

Der LTT-Borrelien korreliert mit der Borrelienserologie.

Aber:

Welche zusätzliche Information kann der LTT-Borrelien liefern ?

Frage:

Verändert die antibiotische Therapie das Ergebnis des LTT-Borrelien ?



Verlaufsuntersuchungen bei Patienten mit positivem LTT- Borrelien

(LTT-Kontrolle 4 - 8 Wochen nach Therapieende)

Frühe Manifestationen n = 140 (vor Therapie SI > 5)

nach Therapie SI < 2 n = 109 (77,8 %)

SI < 3 n = 20 (14,3 %)

SI < 5 n = 9 (6,4 %)

SI > 5 n = 2 (1,5 %)

Späte Manifestationen n = 90 (vor Therapie SI > 5)

nach Therapie SI < 2 n = 20 (22,3 %)

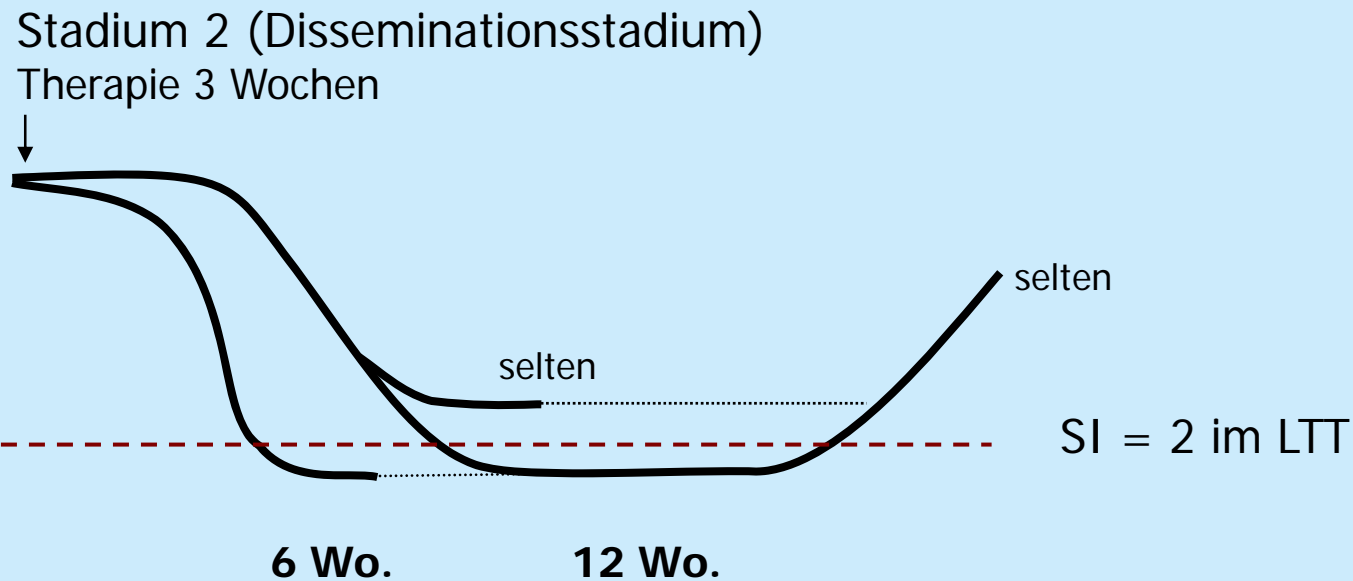
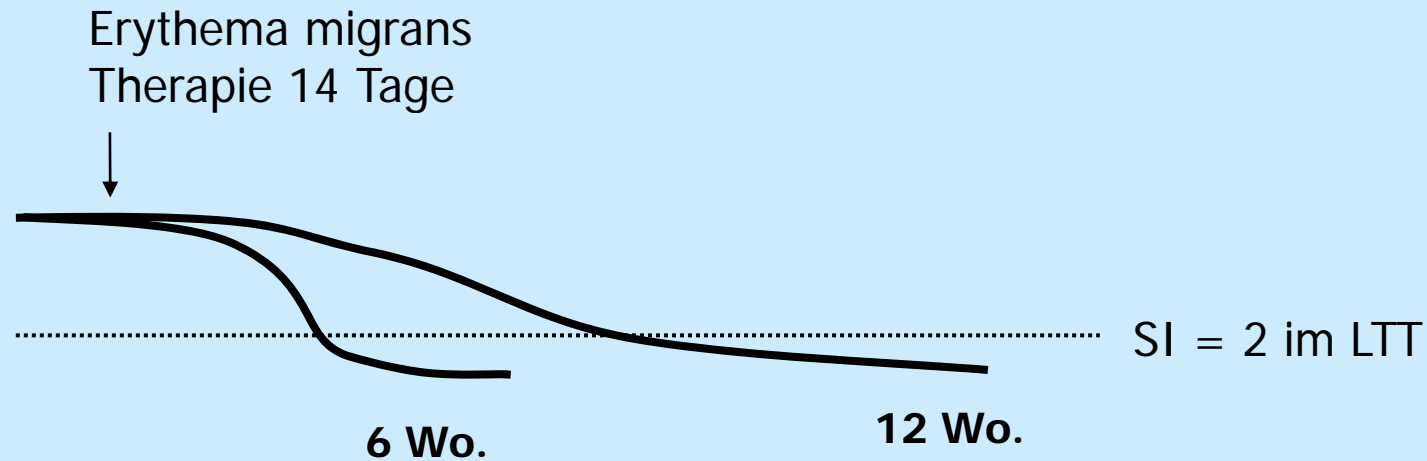
SI < 3 n = 28 (31,0 %)

SI > 3 < 5 n = 32 (35,6 %)

SI > 5 n = 10 (11,1 %)

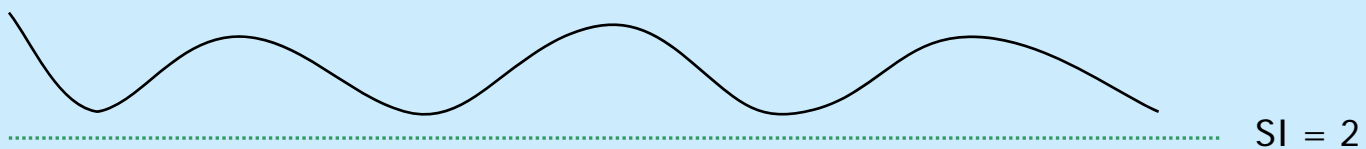
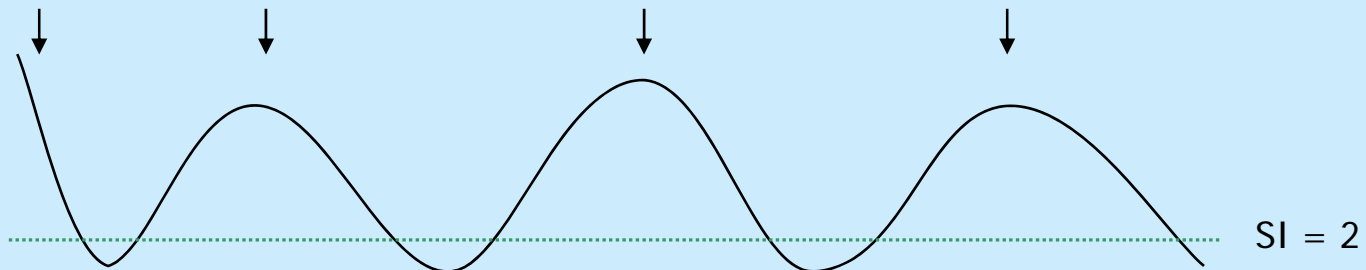
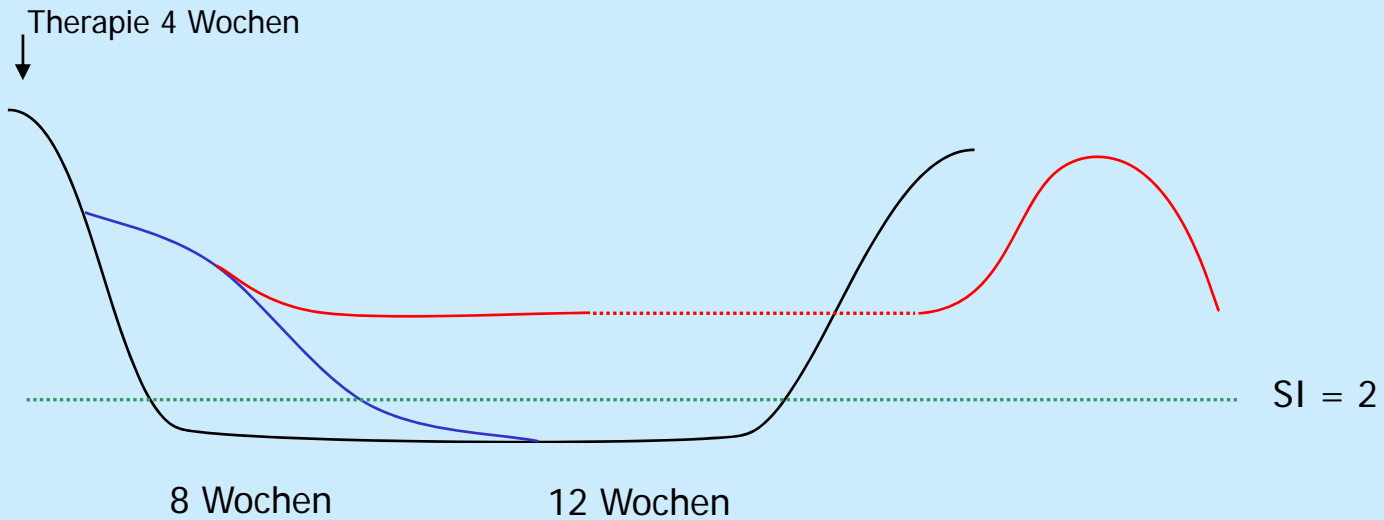


Verlauf des LTT-Borrelien bei Frühformen der Borrelien





LTT-Verläufe bei Spätformen der Borreliose





Der positive LTT-Borrelien wird nach erfolgreicher antibiotischer Therapie i.d.R. negativ.

Warum ?

Borrelienspezifische T^H-Zellen rezirkulieren nur dann im Blut, wenn das Immunsystem Borrelienantigene „sieht“.

Diese T^H-Zellen persistieren jedoch in Lymphknoten und Milz. Bei einer Reaktivierung der Borrelieninfektion gelangen sie wieder in das Blut. Der LTT-Borr. wird erneut positiv.

Aber !

Der negative LTT-Borr. schließt eine frühere Borrelieninfektion und damit die Möglichkeit einer zukünftigen Reaktivierung nicht aus. Dafür ist nur der Antikörpernachweis bedingt geeignet.

Deshalb !

Für die Beurteilung der Situation sind die Borrelienserologie und der LTT-Borrelien notwendig.



Wann können falsch positive LTT-Borr.-Ergebnisse auftreten ?

- Bei akuten fieberhaften Infektionen mit Lymphomonozytose ;
- während einer intensiven immunstimulierenden Behandlung ;
- bei Infektionen mit kreuzreagierenden Erregern (Treponemen, Rickettsien, Leptospiren)

Wann können falsch negative LTT-Borr. Ergebnisse auftreten ?

Bei funktionalen Störungen der T-Helferzellen:
immunsuppressive Behandlung, Chemo-, Strahlentherapie
HIV-Infektion, fortgeschrittene Immunoseneszenz



Indikationen für den LTT-Borrelien

- **Klinischer Verdacht auf Borreliose**
 - unklare Serologie
 - Therapieindikation ?
- **Therapiekontrolle (4 Wochen nach Beendigung)**
- **Persistenz der Beschwerden nach Therapie**
Fragestellung: Hinweis auf Erregerpersistenz
- **Verdacht auf Reaktivierung**



Methodenkritik zum LTT-Borrelia (1)

1. Trotz Einsatz von moderner Labortechnik ist ein hoher Anteil an manueller Arbeit unter Sterilbedingungen unvermeidlich. Die strikte Einhaltung einer bis ins Detail gehenden Arbeitsvorschrift ist wegen der Störanfälligkeit unbedingt notwendig.
(Der LTT ist als Methode für eine Promotion von Medizinern nicht geeignet.)
2. Inkubationszeit von 6 Tagen für den antigenspezifischen LTT
3. Entscheidend für die Qualität (Sensitivität und Spezifität) eines jeden antigenspezifischen Testes ist die Auswahl geeigneter Antigene mit möglichst großer „diagnostischer Breite“. D.h., jene Antigenkonzentration, die gerade noch keine unspezifischen Stimulationen bei einer großen Anzahl von seronegativen gesunden Probanden zeigt, muss bei klinisch eindeutigen Fällen positive Reaktionen hervorrufen.



Methodenkritik zum LTT-Borrelien (2)

Was sind die häufigsten Einwände gegen den LTT-Borrelien ?

1. „Überflüssig“, da die B.infektion durch die Serologie sicher nachgewiesen wird.

Bei Frühmanifestationen ist dieses eindeutig nicht der Fall.

Die Serologie kann nicht zwischen einer floriden und einem Zustand nach einer B.infektion unterscheiden.

Die Serologie ist für die Erfolgsbeurteilung einer antibiotischen Behandlung nicht geeignet.

2. „Häufige falsch positive Reaktionen“

Eine bekannte deutsche Dermatologin: „Der LTT-Borrelien bringt bis zu 46 % falsch positive Reaktionen.“ !!

Fazit: Die gewählten Antigene waren nicht geeignet oder die Testkonzentrationen zu hoch. Der Test wurde nicht lege artis erarbeitet und validiert.



Fazit zum LTT-Borrelien

Es konnte nachgewiesen werden, dass es mit dem LTT-Borrelien prinzipiell möglich ist, zwischen einer floriden und nicht aktiven Borrelieninfektion zu unterscheiden und das Ergebnis einer antibiotischen Behandlung zu beurteilen.

Diese Methode ist aber sehr aufwändig, stör anfällig und benötigt 6 Tage bis zum Vorliegen des Resultates.

Deshalb ist es notwendig, nach methodischen Alternativen zu suchen, die einen geringeren Aufwand erfordern, nach kürzerer Zeit ein Ergebnis liefern und die gleichen Aussagen wie der LTT erlauben.



Ausgangspunkt für methodische Alternativen zum LTT

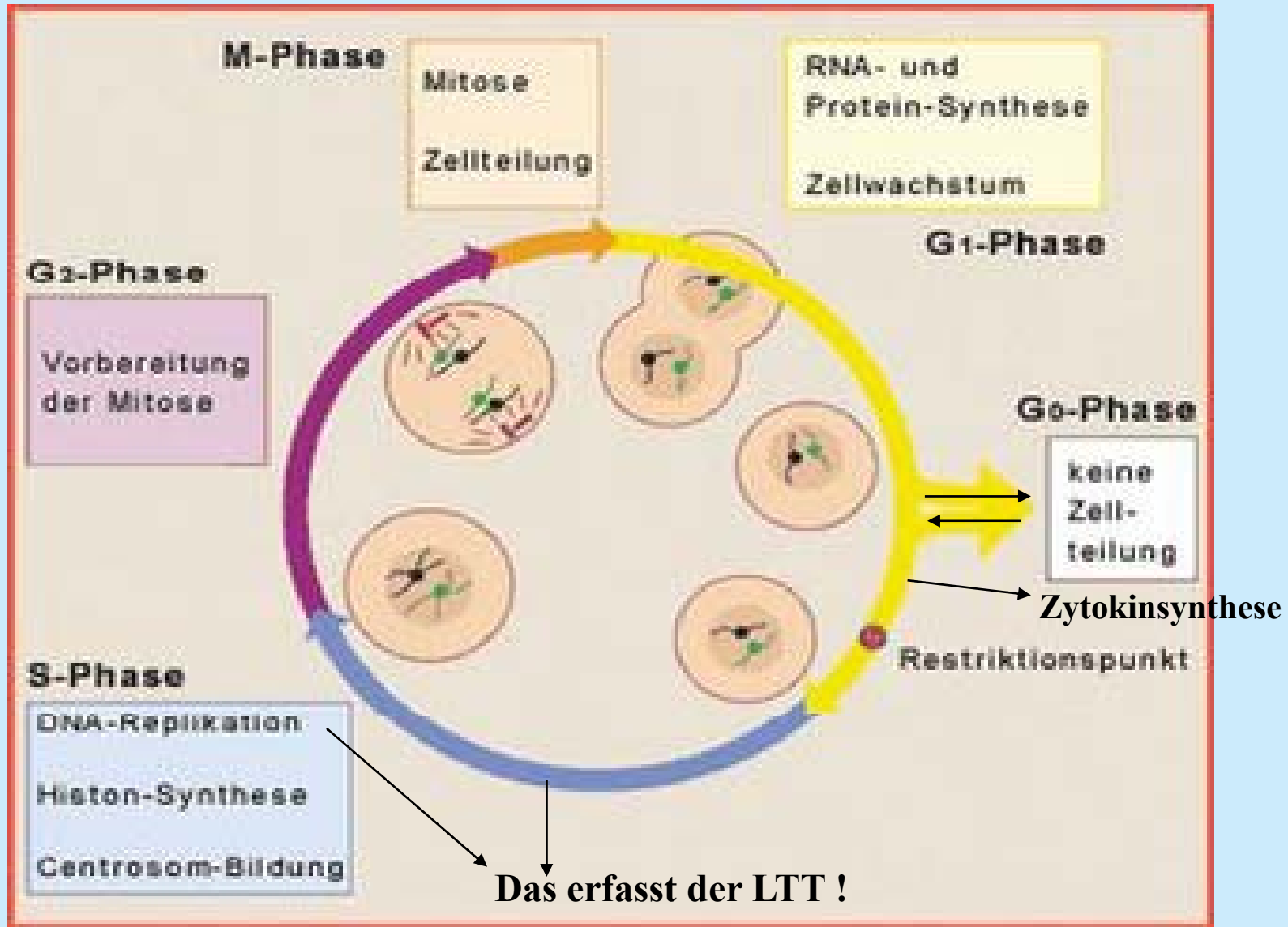
Die antigenspezifische Aktivierung von T-Zellen führt zur

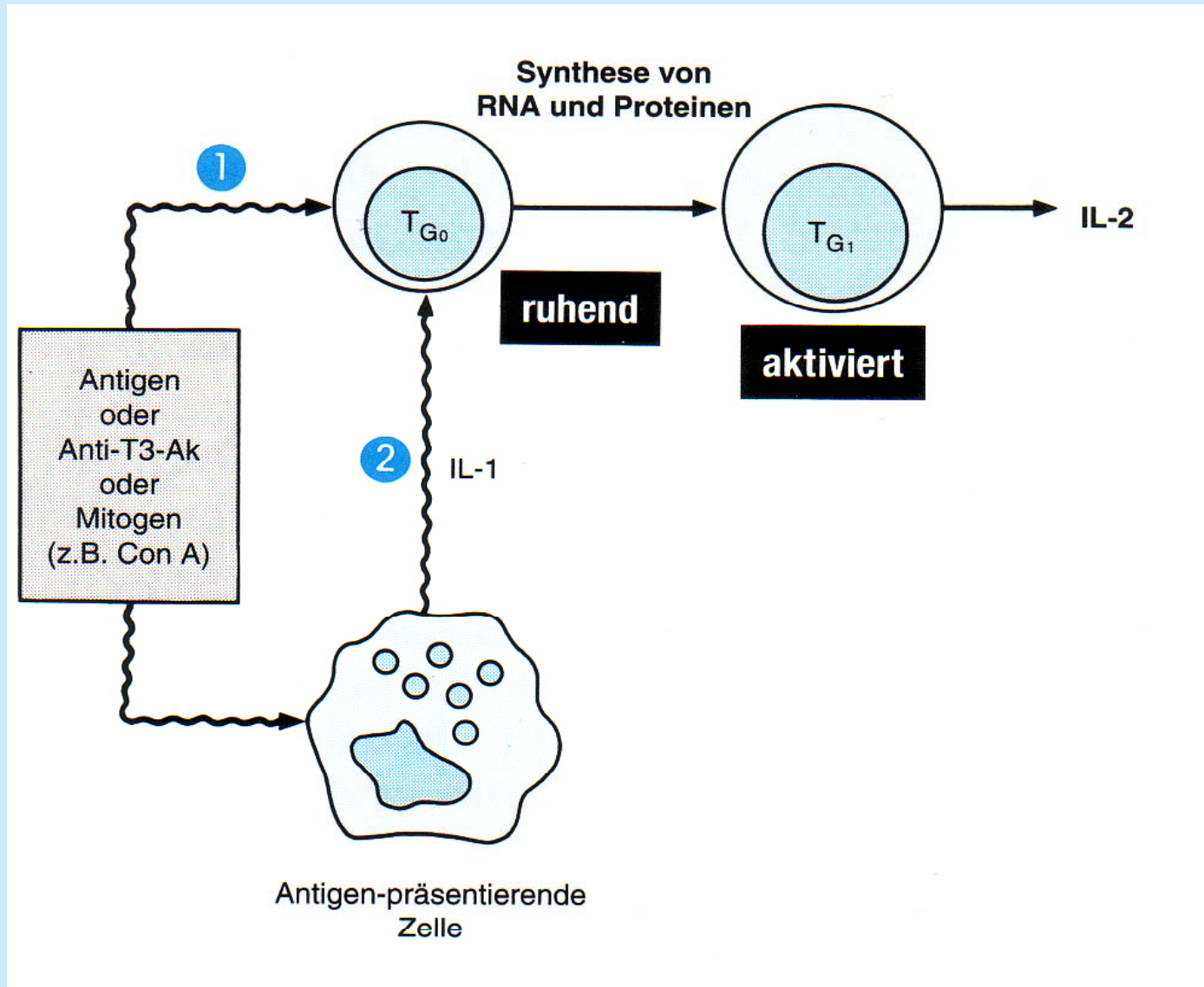
- klonalen Proliferation (Methode: LTT)
- Expression von prä- (z.B. CD25) und postmitotischen Aktivierungsantigenen (z.B. MHC II) auf der Zelloberfläche (Methode: Zytofluorometrie)
- Synthese und Freisetzung von Zytokinen (z.B. Interleukin 2, Interferon γ)

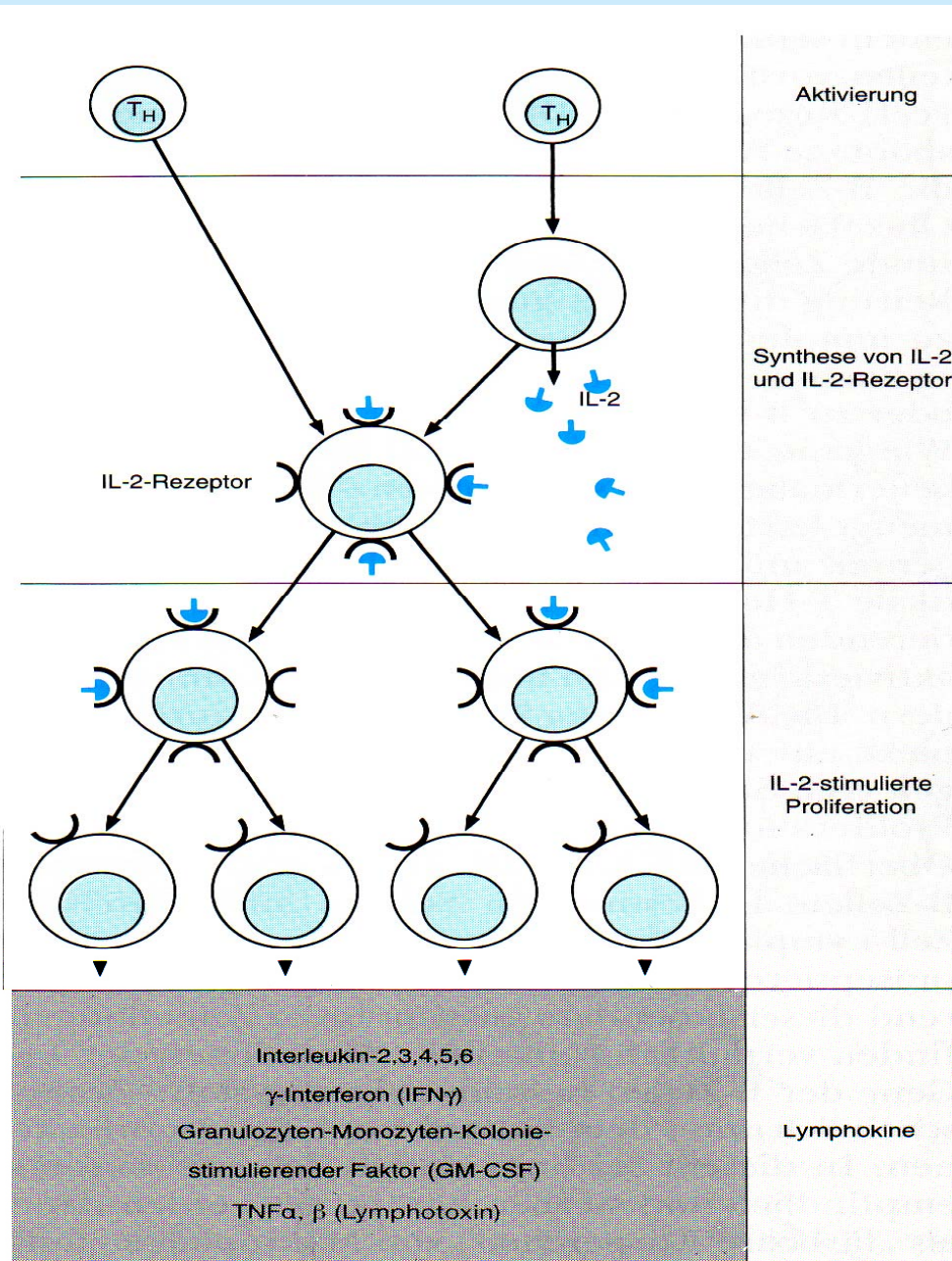
Deren Messung erfolgt im Überstand oder auf der Ebene der Anzahl zytokinproduzierender Zellen (EliSpot).



Der Zellzyklus (Dauer bei T-Zellen ~ 24 Stdn.)

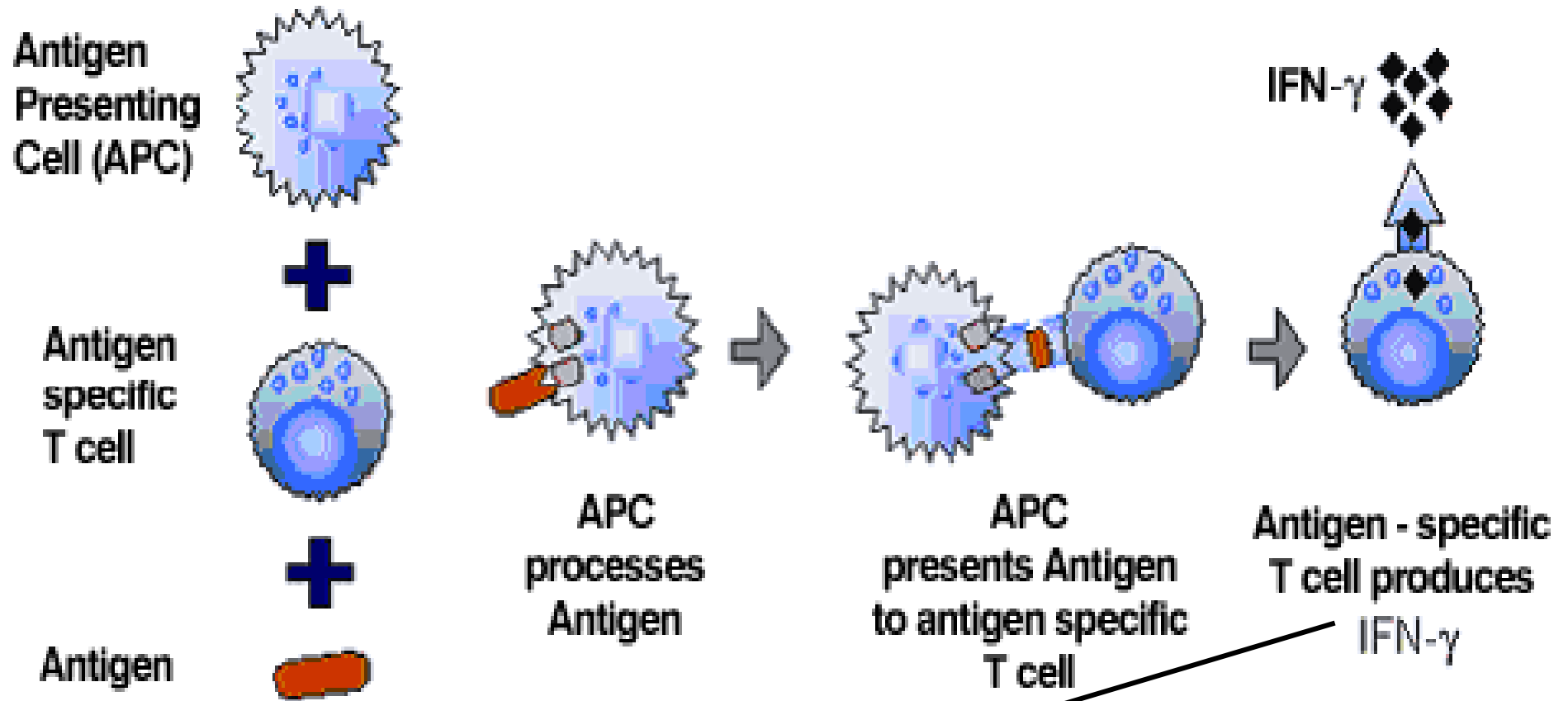








Das Prinzip von QuantiFERON- und EliSpot- Test



Messung von Zytokinen im Überstand (s. Quantiferon-Test)
oder als Anzahl zytokinproduzierender Zellen (EliSpot-Test)



Quantiferon-TB-Test

- in vitro-Test mit **Vollblut** (5 ml Heparinblut)
- Präanalyt. Voraussetzungen:
 - Keine immunsuppressive Behandlung
 - Keine Immundefekte (u.a. AIDS)
- Ein positives Ergebnis bedeutet :
 - Es besteht eine Infektion mit M. tuberculosis.
 - **Eine Unterscheidung zwischen latenter und aktiver Infektion ist nicht möglich.**
- Ein negatives Ergebnis sagt aus:
 - Eine Infektion mit M. tuberculosis liegt nicht vor.
- Vorteil gegenüber Tuberkulin-Hauttest:
 - BCG-Geimpfte reagieren nicht positiv.
 - Ablesen des Testergebnisses nach 48 Stdn. entfällt



Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
Quantiferon-Tb-Test i. Heparinblut			
Der Test quantifiziert durch Messung der ESAT-6 und CFP-10 stimulierten IFNg-Sekretion die zellvermittelte Immunreaktion auf eine Tuberkuloseinfektion.			
ESAT-6	<0.35	IU/ml	< 0.35
CFP-10	<0.35	IU/ml	< 0.35
Mitogenkontrolle	6.44	IU/ml	> 0.50

Interpretation

Der Befund zeigt keine IFNg-Sekretion auf die Tbk-spezifischen Antigene, was gegen das Vorliegen einer stattgefundenen Infektion mit Mycobakterium tuberculosis spricht. Hinweis: Bei schweren Immundefizienzen (z.B. HIV) kann der Test falsch negativ sein, ggf. empfehlen wir eine Kontrolluntersuchung oder die mikrobiologische und molekularbiologische Diagnostik.

Dieser Befund wurde validiert durch Herrn Dr.V.von Baehr

Berlin, den 25.11.2005

Wir danken für die Überweisung.



Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
Quantiferon-Tb-Test i. Heparinblut			
Der Test quantifiziert durch Messung der ESAT-6 und CFP-10 stimulierten IFNg-Sekretion die zellvermittelte Immunreaktion auf eine Tuberkuloseinfektion.			
ESAT-6	2.54	IU/ml	< 0.35
CFP-10	5.34	IU/ml	< 0.35
Mitogenkontrolle	7.48	IU/ml	> 0.50

Interpretation

Der Befund zeigt eine positive Reaktion und spricht somit für das Vorliegen einer stattgefundenen Infektion mit Mycobacterium tuberculosis.

Hinweis: Mit dem Quantiferon-Tb-Test kann nicht zwischen einer latenten Infektion und einem aktiven Stadium unterschieden werden. Bei Verdacht auf aktive Tuberkulose empfehlen wir die mikrobiologische und molekularbiologische Diagnostik.

Dieser Befund wurde validiert durch Herrn Dr.V.von Baehr

Berlin, den 25.11.2005

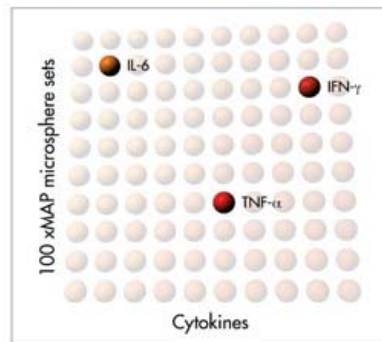
Wir danken für die Überweisung.



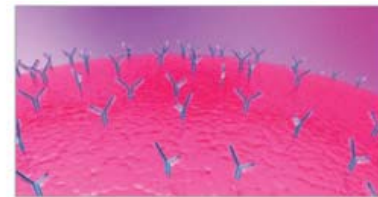
Luminex-Technologie zum synchronen Nachweis mehrerer Zytokine im Überstand

Methode

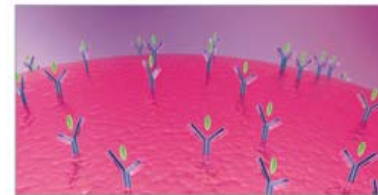
xMAP Technology Process Flow



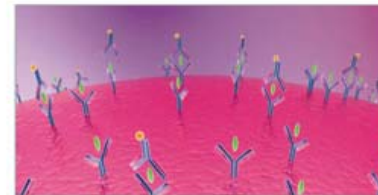
1. Microspheres are dyed to create 100 distinct colors



2. Microspheres are coated with capture antibody



3. Sample is added to microspheres and analyte is captured



4. Fluorescent tagged detection antibody is added



5. Lasers detect both bead dyes and tagged detection antibody



Stimulation der Zytokinsynthese von mononukleären Zellen aus dem Blut in der Kurzzeitkultur (16 Stunden)

Maximalstimulation mit ConA/SEB bei 95 Probanden

(pg/ml)	max	min	MW	StAW	Referenzbereich
Interleukin 2	1824	132	548	295	400-1000
Interleukin 4	803	13	206	139	50- 250
Interleukin 10	5418	468	1671	791	800-2000
Interleukin 17	634	2	177	139	60- 550
Interferon γ	5209	123	936	756	450-2000

Problem: Es gibt High- und Lowresponder, besonders für IFN γ , Interleukin 4 und 17 !



Kurzzeitstimulation von Blut-MNZ mit Borrelienantigenen

Borrelienantigene (Konzentration wie bei LTT) :

rOspC

Lysatmix aus B.s.s., afzelii und garinii

MNZ/Ansatz: **200 000** (Dreifachansätze zur Messung gepoolt)

Inkubationszeit: **16 Stunden**

Messung von : **IL 2 , IL 10, INF γ , IP 10** (IFN γ induziert)

Alle Ansätze parallel zu LTT-Borrelien

1. Phase: 30 gesunde sero- und LTT negative Probanden
Ergebnis: IL10 wird durch B.antigene unspezifisch induziert, andere Zytokine unauffällig
2. Phase: 110 Patn.(Einsendungen) Fragestellung Borreliose ?



Ergebnisse Phase 2 (Zytokinstimulation durch Borr.antigene)

110 Ein^Esendungen mit Fragestellung Borreliose ?

- 1. IL10 wird unspezifisch induziert (n= 88/110)**
- 2. Unspezifische Induktion von IP10 (n= 54/110)**
bei Probeentnahme im Labor u. sofortiger Verarbeitung nicht nachweisbar !
- 3. LTT SI> 5 (seropositiv) IL2 u. IFN γ nachweisbar (n= 11/100)**
- 4. LTT SI>3<5 (seropositiv) IL2> IFN γ nachweisbar**
(gesamt n= 11/100; IL2: 7/11; IFN γ : 5/11)
- 5. LTT negativ (seropositiv) nach antibiot.Therapie (n=10) IL2**
positiv 2/10; IFN γ 1/10
- 6. LTT negativ und seronegativ (n=78) IL2 und IFN γ negativ**

**Fazit: Die Ergebnisse sind für IL2 und IFN γ ermutigend.
Die Studie wird fortgeführt.**

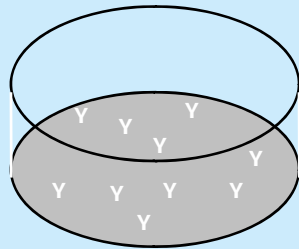


Was ist EliSpot?

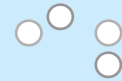
Einige Folien zum EliSpot sind einem Vortrag von Dr. V. Schöllhorn (Fa. AID) während der DELAB-Tagung im Mai (2008) entnommen.



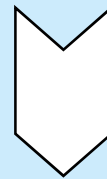
Das Prinzip (I)



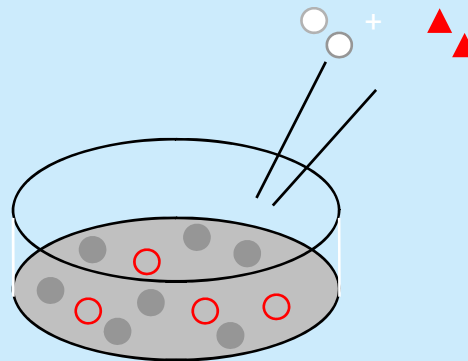
Elispot-Well coated with monoclonal, cytokine specific antibody (IFN γ , IL10 etc.)



Lymphocyten-Isolation



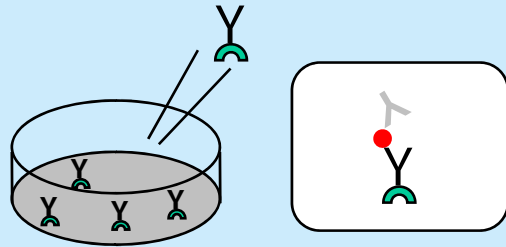
Incubation with cells and antigen, specific cells release cytokine



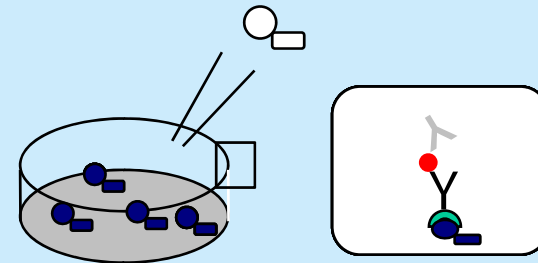
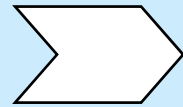
Schöllhorn 2008



Das Prinzip (II)



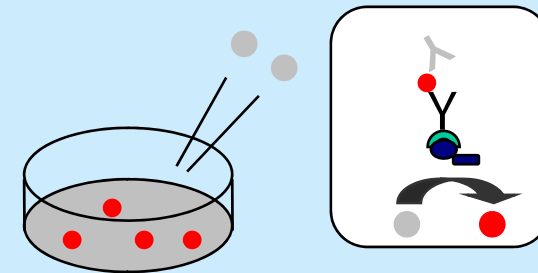
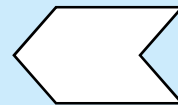
Add biotinylated secondary antibody
Complex: pr.AB/Cytokine/sec.AB



Add Streptavidin-enzyme
conjugate



analysis

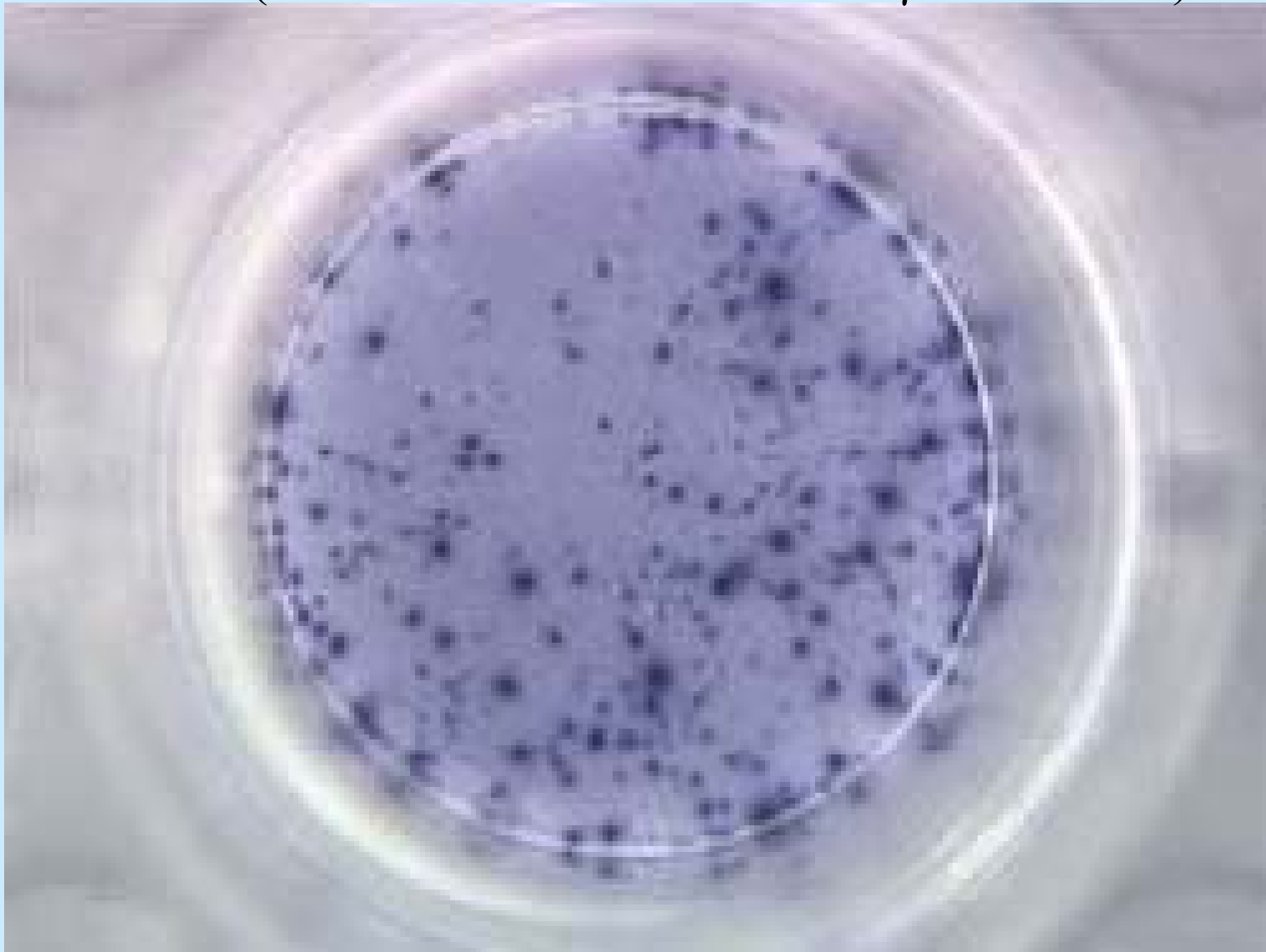


Add substrate color development

Schöllhorn 2008

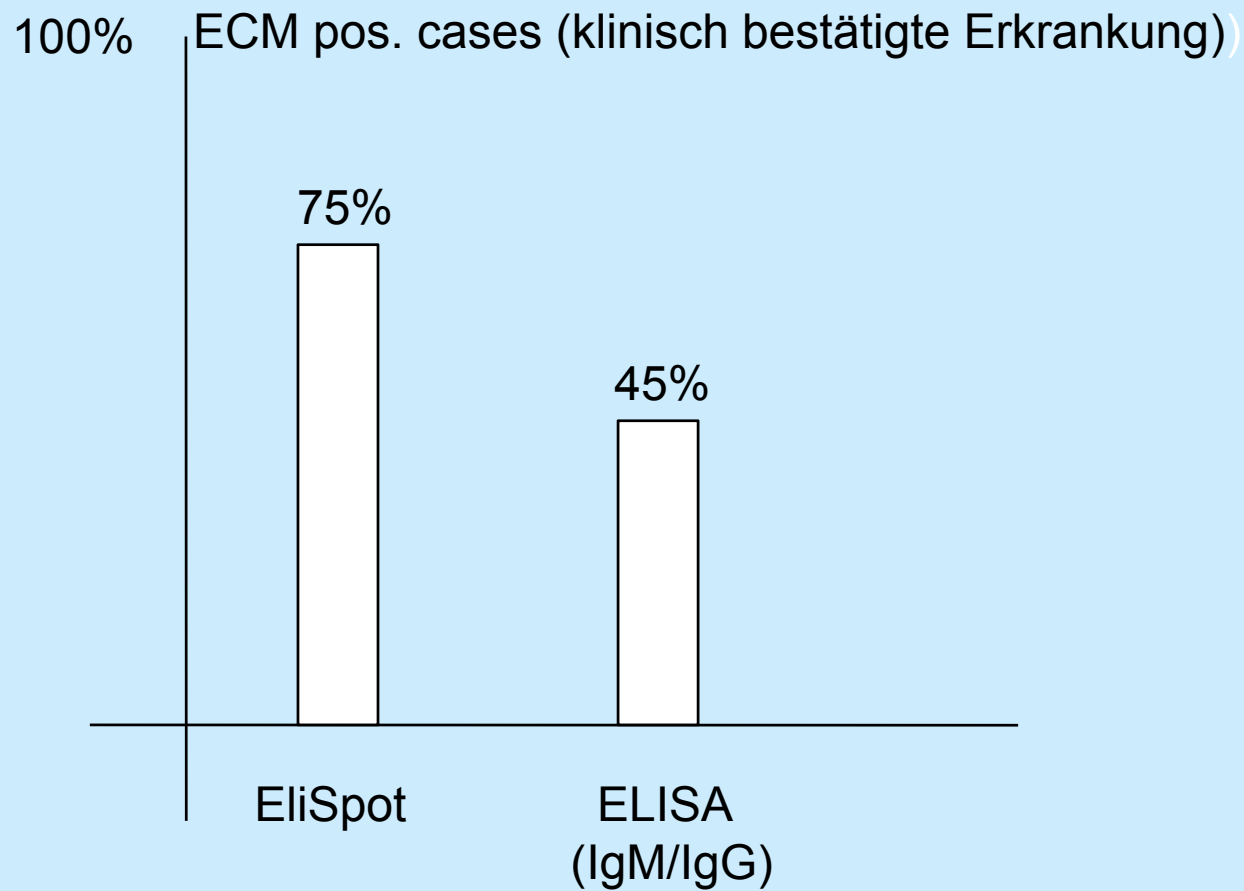


ELISPOT- Platte (Stimulation mit PWM – IFN γ - Nachweis)





ELISA / EliSpot bei der Lyme- Diagnose





Sensitivität des Elispots bei klinisch gesicherter Diagnose

	Anzahl	Borrelien Vollantigen positiv	Positive Ergebnisse in %
Klinisch gesicherte Borreliose	169	116	68,64
externe Kontrollen	130	12	9,23
Interne Hauskontrolle	22	2	9,09
Autoimmun Erkrankungen	148	35	23,65



Therapie Monitoring

Therapierte Patienten	47	
Erfolgreich (Elispot Borr neg)	26	55%
Nicht erfolgreich (Elispot pos)	16	34%
Grenzwertiges Resultat	5	11%
Erfolglos Therapierte (Borr.pos)	16	
Anaplasma positiv (Elispot)	14	87,5%
Anaplasma negativ (Elispot)	1	6%
Grenzwertiges Resultat	1	6%

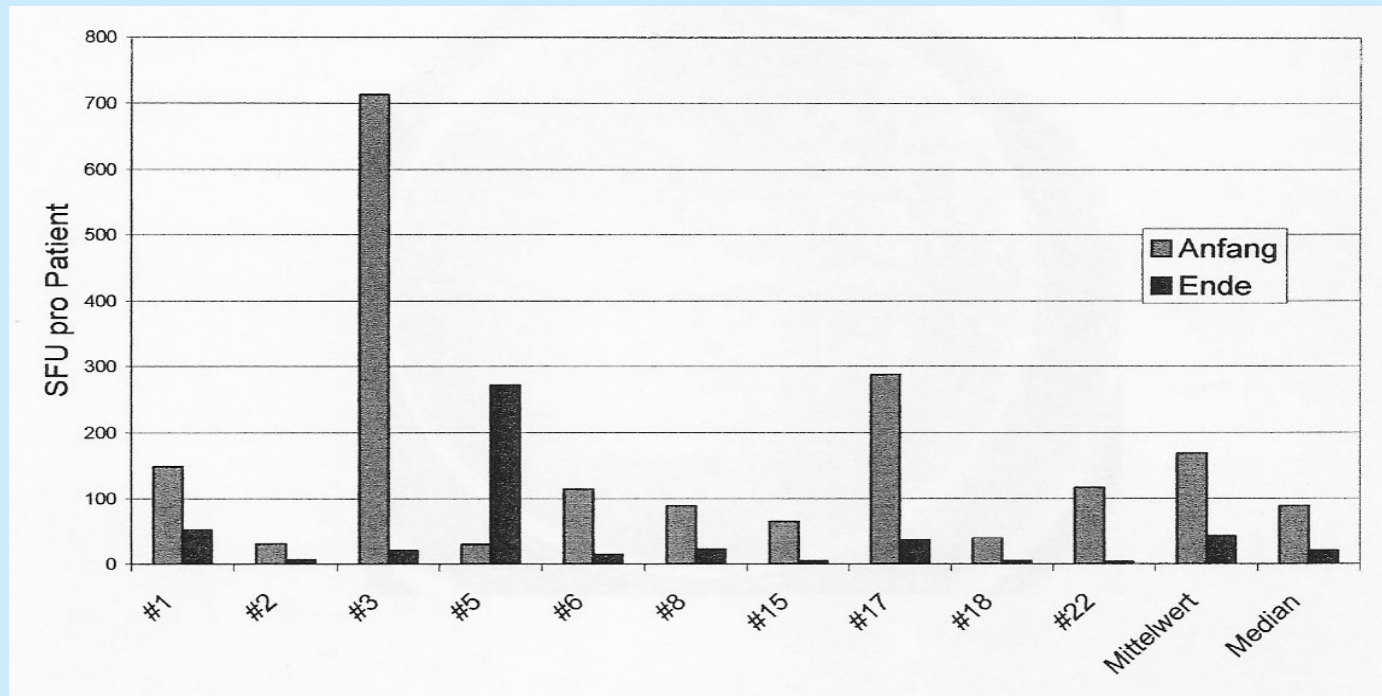


EliSpot bei Behandlungsüberwachung von Lyme Krankheit

(II)

Pfeiffer et al., 2003

(Dissertation Uni Erlangen ?)

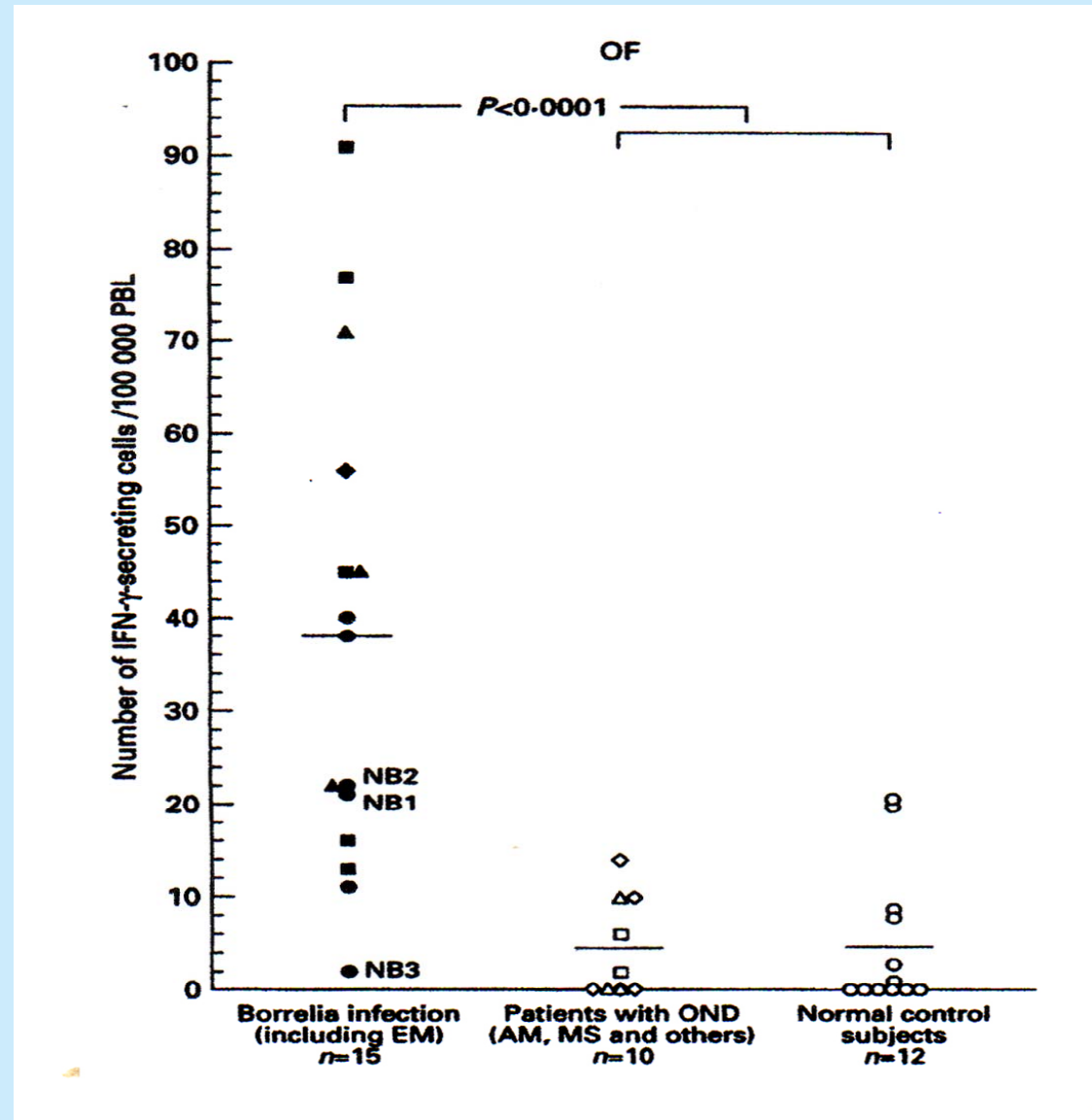


Schöllhorn 2008

Anmerkung : Iris Eckmüller
(Dissertation Uni MÜNCHEN 2003)
findet nach Therapie Anstieg der SFU



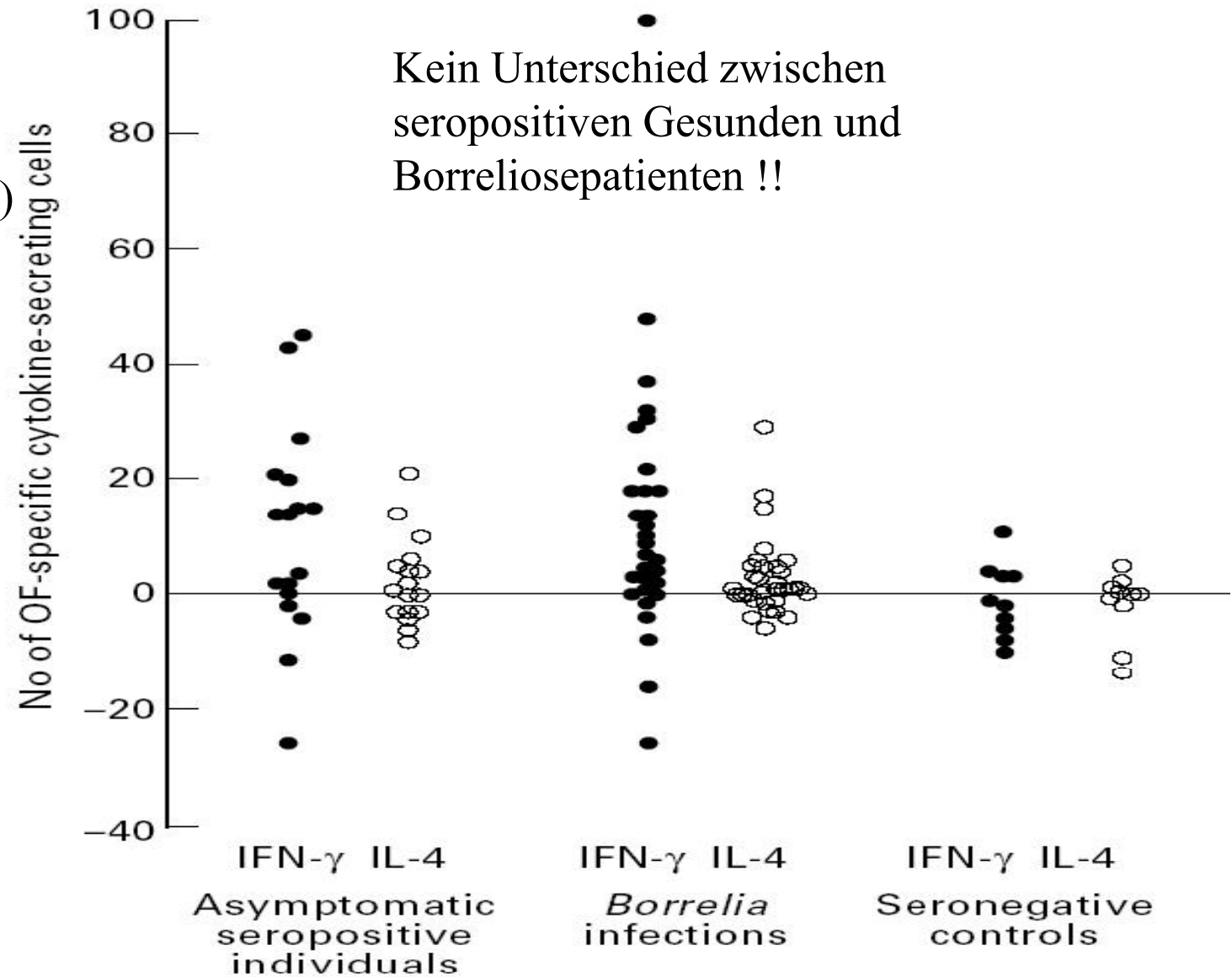
Erstbeschreibung des
EliSpot-Borrelien
mit Blutlymphozyten
(bei AID zitiert)



Forsberg P et al. Clin Exp Immunol. 1995; 101: 453-460



Die gleiche Gruppe
(bei AID nicht zitiert)



Ekerfelt C et al. Clin Exp Immunol 1999; 115: 498-502

Ekerfelt C et al. Scand J Infect Dis. 2001; 33: 806-808 (gleiche Aussage)



Aussagen des Herstellers von EliSpot-Borrelien-Testkits:

1. Ist EliSpot gleichbedeutend mit ELISA ?

Während der Borrelien-ELISA Antikörper der Klassen IgG und IgM erfasst, weist der EliSpot die spezifische Zytokinabgabe von T-Helferzellen nach. Der EliSpot ist darüberhinaus sehr viel sensitiver (bis zu 200x) und spezifischer als der ELISA.

2. Kann EliSpot eine Antibiotika-Therapie überwachen ?

Ja. Das ist möglich. EliSpot ist die einzig bislang entwickelte Methode, die es erlaubt, anhand der gemessenen Anzahl von T-Helferzellen den Verlauf der Antibiotika-Therapie darzustellen. Dies ist bei Betrachtung von Antikörpern nicht möglich.

3. Im Vergleich zu anderen Infektionserkrankungen wie Tuberkulose oder Hepatitis C liegen bei der Borreliose noch recht wenige Daten vor. Es müssen in jedem Fall noch weitere Daten generiert werden.



Zusammenfassung

1. Mit dem LTT- Borrelien werden Borrelien-spezifische T- memory Lymphozyten nachgewiesen. Der Test sollte besonders dann für die Borreliosedagnostik eingesetzt werden, wenn der Antikörpernachweis kein klares Bild ergibt, bzw. ein Widerspruch zwischen Anamnese, Symptomatik und serologischem Befund besteht.
2. Ein positiver LTT- zeigt an, dass das Immunsystem Borrelienantigene „sieht“- ein Hinweis auf eine aktive Auseinandersetzung mit Borrelien
3. Nach einer antibiotischen Therapie sind die LTT-SI-Werte für Borrelienantigene rückläufig, meist wird der Test negativ. Antikörper bleiben dagegen lange positiv. Bei Reaktivierung einer Borrelieninfektion wird der LTT-Borrelien wieder positiv.
4. Methoden zum Nachweis der Borr.antigen-induzierten IL2- und IFN γ -Synthese (EliSpot oder Überstandsmessungen) sind mögliche Alternativen für den LTT, müssen aber in Studien im Vergleich zum LTT und zur Borrelienserologie weiter evaluiert werden.



Dank an folgende Mitarbeiter/innen:

Dr. Conny Doebis

Sandra Hartfil

Jana Letzin

Dr. Volker von Baehr