

Neuartiger Lymphozyten-Transformations-Test (LTT-MELISA®) zum Nachweis einer Lyme-Borreliose^{1),2)}

A novel lymphocyte transformation test (LTT-MELISA®) for Lyme borreliosis

Elizabeth Valentine-Thon^{1,*}, Karsten Ilsemann²
und Martin Sandkamp³

¹ Immunologie-Abteilung und Serologie-Abteilung des
Laborzentrum Bremen, Bremen, Deutschland

² Serologie-Abteilung des, Laborzentrum Bremen
Bremen, Deutschland

³ Laborzentrum Bremen, Bremen, Deutschland

Zusammenfassung

Die Diagnose einer aktiven Lyme-Borreliose (LB) stellt immer noch eine Herausforderung bei klinisch nicht eindeutigen, serologisch nicht zuordnungsfähigen und PCR-negativen Patienten dar. Verschiedene Lymphozyten-Transformations-Tests (LTT) wurden zur Feststellung einer zellulären Reaktivität eingesetzt, deren klinische Anwendbarkeit jedoch erheblich durch den Einsatz ungenügend definierter Borrelien-Antigene und nicht-standardisierter LTT-Verfahren eingeschränkt war. In der vorliegenden Studie stellen wir die Entwicklung und klinische Relevanz eines neuen LTT unter Einsatz eines validierten Verfahrens (MELISA®) und der Verwendung definierter rekombinanter Borrelien-Antigene vor. Nach einem initialen Screening von 244 Patienten mit Verdacht auf eine Borrelien-Infektion bzw. -Erkrankung wurden vier aussagefähige rekombinante Antigene ausgewählt: OspC

(*Borrelia afzelii*), p41-int 1 (*Borrelia garinii*), p41-int 2 (*B. afzelii*) und p100 (*B. afzelii*). Anschließend wurden 30 seronegative gesunde Probanden im LTT-MELISA® untersucht, um die Spezifität festzustellen, 68 Patienten parallel analysiert, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, und 54 Lymphozyten-reaktive, symptomatische Patienten vor und nach Antibiotikatherapie getestet, um die klinische Relevanz des Tests zu evaluieren. Die Mehrzahl (86,2%), der im initialen Screening untersuchten und LTT-MELISA®-positiven Patienten (36,9%), waren seropositiv und zeigten Symptome einer aktiven LB. Die Spezifität betrug 96,7%, die Reproduzierbarkeit 92,6%. Nach Therapie zeigten die meisten Patienten (90,7%) keine persistierende oder eine erheblich reduzierte Lymphozyten-Reaktivität, welche mit einer klinischen Besserung einherging. Der vorgestellte neuartige LTT-MELISA® scheint mit aktiver LB zu korrelieren und dürfte diagnostische Relevanz in der Abklärung klinisch und serologisch nicht eindeutiger Fälle aufweisen.

Schlüsselwörter: Lyme-Borreliose; Lymphozyten-Transformations-Test; MELISA®; rekombinante Antigene.

Abstract

Diagnosis of active Lyme borreliosis (LB) remains a challenge in clinically ambiguous, serologically indeterminate and polymerase chain reaction-negative patients. Lymphocyte transformation tests (LTT) have been applied to detect specific cellular immune reactivity, but their clinical application has been severely hampered by the poorly defined Borrelia antigens and non-standardized LTT formats used. In this study, we describe the development and clinical relevance of a novel LTT using a validated format (MELISA®) together with well-defined recombinant Borrelia-specific antigens. From an initial screening of 244 patients with suspected Borrelia infection or disease, four informative recombinant antigens were selected: OspC (*B. afzelii*), p41-int 1 (*B. garinii*), p41-int 2 (*B. afzelii*) and p100 (*B. afzelii*). Thereafter, 30 seronegative healthy controls were tested using the LTT-MELISA® to

¹⁾Vorläufige Ergebnisse dieser Studie wurden auf dem 5. Internationalen Symposium für Molekulare Diagnostik in der Laboratoriumsmedizin in Graz, Österreich, 10.–12. Juni 2004, und auf der 10. Internationalen Konferenz für Lyme-Borreliose und andere zeckenübertragene Erkrankungen in Wien, Österreich, 11.–15. September 2005 vorgestellt.

²⁾Übersetzung folgender Publikation: Valentine-Thon E, Ilsemann K, Sandkamp M: A novel lymphocyte transformation test (LTT-MELISA®) for Lyme borreliosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2007;57:27–34 (mit freundlicher Genehmigung).

*Korrespondenz: Dr. Elizabeth Valentine-Thon, Immunologie-Abteilung, Laborzentrum Bremen, Friedrich-Karl-Str. 72, 28205 Bremen, Deutschland
Tel.: +49 (421) 4307-305
Fax: +49 (421) 4307-199
E-mail: evt@laborzentrum-bremen.de

determine specificity, 68 patients were tested in parallel to determine reproducibility, and 54 lymphocyte reactive, symptomatic patients were tested before and after antibiotic therapy to assess clinical relevance. Most (86.2%) of the 36.9% (90/244) LTT-MELISA®-positive patients were seropositive and showed symptoms of active LB. Specificity was 96.7%, and reproducibility 92.6%. After therapy, most patients (90.7%) showed negative or markedly reduced lymphocyte reactivity correlating with clinical improvement. This novel LTT-MELISA® assay appears to correlate with active LB and may have diagnostic relevance in confirming LB in clinically and serologically ambiguous cases.

Keywords: Lyme borreliosis; lymphocyte transformation test; MELISA®; recombinant antigens.

Einleitung

Die Lyme-Borreliose (LB) ist die häufigste vektorübertragene Erkrankung in Europa und den USA und die Prävalenz scheint zuzunehmen [1]. Die Krankheit wird durch Zecken übertragen, die das infektiöse Agens *Borrelia burgdorferi* sensu lato tragen. Während in Europa alle drei humanpathogenen Arten *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* und *B. garinii* ätiologisch beteiligt sind, scheint in den USA *B. burgdorferi* sensu stricto die einzige LB-verursachende Spezies zu sein [2, 3].

Als Multisystemerkrankung weist LB ein breites Spektrum klinischer Manifestationen auf. Nur das Erythema Migrans (EM), eine vorübergehende Rötung im Bereich des Zeckenstiches, die Tage bis Wochen nach der Infektion auftritt, scheint pathognomonisch zu sein, jedoch tritt es nur bei etwa 60% der LB-Patienten auf. Alle anderen nichtkutanen Symptome treten bei einer Vielzahl von Erkrankungen auf und machen eine klinische Diagnose problematisch [2, 3].

Routinemäßig vorgenommene Laboratoriumsuntersuchungen basieren auf dem Nachweis der humoralen Immunantwort gegen Borrelien-spezifische Antigene

nach einem Zwei-Stufen-Format. In einem ersten Schritt wird ein Screening mittels Enzymimmunoassay (ELISA) durchgeführt, bei positiven oder grenzwertigen Ergebnissen werden in einem zweiten Schritt Bestätigungstests mit spezifischeren Immun- oder Westernblot-Tests abgeschlossen. Während serologische Untersuchungen eine durchgemachte Infektion bestätigen können, können sie eine bestehende Erkrankung nicht beweisen. Weiterhin sind serologische Tests im frühen Krankheitsstadium oft noch negativ, Antikörper können auch nach erfolgreicher Therapie noch über Jahre persistieren und Ergebnisse aus unterschiedlichen Laboratorien können voneinander abweichen [4–6]. Der mikrobiologische Nachweis oder die PCR sind zwar hochspezifisch, aber von eingeschränkter Sensitivität [7]. Während daher eine Infektion mit *B. burgdorferi* oft festgestellt werden kann, bleibt die eigentliche Diagnose der Erkrankung eine Herausforderung. Gleichzeitig scheint eine frühzeitige therapeutische Intervention eine entscheidende Rolle in der Prävention des Fortschreitens der Erkrankung zu spielen [8].

In den vergangenen Jahren wurde durch Untersuchungen der zellulären Immunreaktivität auf *B. burgdorferi* mittels unterschiedlicher Formen des Lymphozyten-Transformations-Tests (LTT) versucht, die Diagnostik der LB zu verbessern (Tabelle 1) [8–18]. Allerdings blieb die klinische Anwendbarkeit des LTT mit Bezug auf die Lyme-Erkrankung durch mangelnde Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit des eingesetzten Tests derart eingeschränkt, dass von der Anwendung eines LTT abgeraten wurde [5]. Mögliche Gründe umfassen die Anwendung nicht validierter und nicht standardisierter LTT-Verfahren mit Einsatz niedriger Lymphozytenkonzentrationen (< 250.000 Zellen/Test) sowie ungenügend definierter, hinsichtlich der Antigene heterogener Lysate aus *B. burgdorferi* oder von Kulturüberständen als Antigene.

In der vorliegenden Studie beschreiben wir eine neue LTT-Modifikation, die zwei Verbesserungen beinhaltet, um die angesprochenen Probleme zu umgehen. Erstens wurde ein standardisierter LTT unter Einsatz einer höheren Zellkonzentration (1×10^6 Zellen/Test) verwendet, der Memory-Lymphocyte-Immunostimulation-Test

Tabelle 1 Beispiele der Anwendung des LTT für die LB-Diagnose.

Anzahl der Proben ^a	Anzahl der Antigene	Antigen-Typ	Veröffentlichung	Jahr
35	1	gesamte <i>B. burgdorferi</i>	Dattwyler et al.	1988
178	3	gesamte/sonifizierte <i>B. burgdorferi</i>	Dressler et al.	1991
74	1	gesamte <i>B. burgdorferi</i>	Krause et al.	1991
24	6	Polypeptid-Fractionen	Yoshinari et al.	1991
26	1	gesamte <i>B. burgdorferi</i>	Zoschke et al.	1991
61	3	gesamte <i>B. burgdorferi</i> + 2 rekombinante Antigene	Krause et al.	1992
12	2	gesamte/sonifizierte <i>B. burgdorferi</i>	Schempp et al.	1993
12	4	gesamte/sonifizierte <i>B. burgdorferi</i> + 3 rekombinante Antigene	Roessner et al.	1994
44	1	gesamte <i>B. burgdorferi</i>	Breier et al.	1995
103	2	gesamte <i>B. burgdorferi</i>	Huppertz et al.	1996
16	1	gesamte <i>B. burgdorferi</i>	Rutkowski et al.	1997

^aeinschl. Patienten und Kontrollen.

(MELISA®) [19]. Seine technische Validität sowie die klinische Relevanz beim Nachweis der zellulären Immunantwort gegen andere Antigene ist ausführlich dokumentiert [20–30]. Zweitens kamen ausschließlich gut charakterisierte rekombinante Borrelien-Antigene zum Einsatz [5, 31–36]. Die Spezifität, Reproduzierbarkeit und die klinischen Möglichkeiten dieses neuartigen LTT-MELISA® werden im Rahmen der LB Diagnostik vorgestellt.

Material und Methoden

Rekombinante Borrelien-Antigene

Acht rekombinante Borrelien-spezifische Antigene, entwickelt in Zusammenarbeit mit dem Max-von-Pettenkofer-Institut, Bundesreferenzzentrum für Borreliose, Universität München, Deutschland [5, 31–36], wurden bezogen (MIKROGEN GmbH, Neuried, Deutschland). Diese Antigene werden üblicherweise in den kommerziellen ELISA- und Westernblot-Tests (MIKROGEN) verwendet. Sie sind abgeleitet von allen drei Borrelien-Spezies und decken die immundominanten Epitope ab, die sowohl für die frühe (IgM) als auch die späte (IgG) humorale Immunantwort charakteristisch sind. Hier wurden sie in Serienverdünnungsreihen, ausgehend von folgenden Ausgangskonzentrationen getestet: OspA (*B. burgdorferi*, 50 µg/mL), OspC (*B. garinii*, 45 µg/mL), OspC (*B. afzelii*, 100 µg/mL), p41 (*B. afzelii*, 50 µg/mL), p41-internes Fragment-1 (*B. garinii*, 50 µg/mL), p41-internes Fragment-2 (*B. afzelii*, 100 µg/mL), p18 (*B. afzelii*, 100 µg/mL) und p100 (*B. afzelii*, 100 µg/mL). Diese Konzentrationen wurden aufgrund von Pilotstudien so gewählt, dass sie weder zytotoxisch noch mitogen auf Humanlymphozyten wirken (Daten nicht dargestellt).

Patientenproben

Die Patientenproben wurden von kooperierenden Arztpraxen als CPDA-Blut (Citrat Phosphat Dextrose Adenin, Sarstedt GmbH & Co., Nümbrecht, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Alle Proben wurden innerhalb von 24 h nach Entnahme verarbeitet. Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) wurden über Ficoll Histopaque (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) unmittelbar nach Eingang im Labor isoliert und entweder direkt im LTT-MELISA® eingesetzt oder in 20% Medium (RPMI-1640 mit HEPES [Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland], 8 mg/L Gentamicin [Sigma-Aldrich Chemie], 2 mmol/L L-Glutamin [Biochrom seromed, Berlin, Deutschland] und 20% gepooltem, hitzeinaktiviertem Humanserum [Cambrex Bio Science Verviers S.p.r.l., Verviers, Belgien]) über Nacht gelagert.

Für das Ausgangsscreening wurden PBMCs von 244 konsekutiven Patienten (102 Männer, 142 Frauen; Alter 2–80 Jahre, Mittelwert 49 Jahre) mit Verdacht auf eine Lyme-Infektion oder eine bestehende Lyme-Erkrankung unabhängig von vorheriger Therapie gegen vier bis acht

verschiedene rekombinante Borrelien-Antigene im LTT-MELISA® getestet. Fast alle Proben stammten aus Deutschland, fünf von Patienten aus England. Für diese Voruntersuchungen kam der übliche Cut-off zur Anwendung (Stimulations-Index [SI] ≥ 3 in mindestens einer Reaktion, siehe unten). Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurden für alle weiteren Tests folgende vier Antigene eingesetzt: OspC (*B. afzelii*), p41-1, p41-2 und p100.

Serologische Daten standen für 157 der 244 Patienten zur Verfügung, entweder mitgeteilt durch den behandelnden Arzt oder in unserem serologischen Labor bestimmt mit dem ELISA Screening-Test Enzygnost Borreliosis getrennt nach IgG und IgM (Dade Behring Marburg, Marburg, Deutschland) und dem Bestätigungsblot recomBlot Borrelia IgG/IgM (MIKROGEN GmbH).

Als gesunde Kontrollen dienten 30 Labormitarbeiterinnen und mitarbeiter ohne erinnerlichen Zeckenstich oder Verdacht einer Lyme-Erkrankung, die gleichzeitig seronegativ im ELISA und Westernblot waren. Die Probanden (5 Männer, 25 Frauen, Alter 22–60 Jahre, Mittelwert 43 Jahre) wurden ein- oder mehrmals gegen die vier beschriebenen Borrelien-Antigene in je drei Verdünnungsstufen getestet.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden Wiederholungsmessungen an 68 zufällig ausgewählten Patienten am selben Tag von einem oder zwei Untersuchern durchgeführt.

Um die Kinetik des LTT-MELISA® im Verlauf einer antibiotischen Therapie zu analysieren, wurden eine oder mehrere Follow-up-Proben von 54 anfangs reaktiven, symptomatischen Patienten (22 Männer, 32 Frauen, Alter 11–74 Jahre, Mittelwert 50 Jahre) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Abschluss der Therapie untersucht.

LTT-MELISA® auf Lyme-Borreliose

Der LTT-MELISA® wurde im Grundsatz durchgeführt wie bereits für die Metallsensibilisierung beschrieben [28], jedoch mit einer größeren Modifikation:

Anstelle von Metalllösungen wurden die 24-Loch-Mikrotiterplatten mit rekombinanten Borrelien-Antigenen in Medium ohne Zusatz von Humanserum vorbeschichtet (50 µL/well). Die beschichteten Platten wurden mit Parafilm abgedichtet und bis zum Gebrauch bei –20°C gelagert.

Testdurchführung: 1×10^6 PBMCs (Monozyten-reduziert durch Adhäsion an eine Plastikoberfläche) in 1 mL 10% Medium wurden pro Loch auf eine mit Borrelien-Antigenen beschichtete Kulturplatte pipettiert (je Antigen drei Verdünnungsstufen) und für fünf Tage bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert. Auf jeder Platte wurden drei negative Kontrollen (Lymphozyten in 10% Medium ohne Antigen) und eine positive Kontrolle (Lymphozyten in 10% Medium plus 2 µg/mL Pokeweed Mitogen [Sigma-Aldrich Chemie]) mitgeführt. Am fünften Tag wurde den Zellen für fünf Stunden 3 µCi/Loch Methyl-³H-Thymidin (Amersham Buchler, Braunschweig, Deutschland; spezifische Aktivität 185 GBq/mmol) zugesetzt und anschließend die

Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen (1450 Microbeta Trilux; Wallac Distribution, Freiburg, Deutschland). Der SI wurde ermittelt durch den Quotienten cpm Test-Antigen/Mittelwert cpm der drei Negativ-Kontrollen. Per Konvention galt als Cut-off für einen positiven Testausfall die Grenze $SI \geq 3$, ein $SI \geq 10$ galt als stark positiv.

Um das Testergebnis weiter abzusichern, wurden die Zellen der Fünf-Tage-Kulturen zusätzlich morphologisch als gefärbtes Cytospin-Präparat beurteilt (Rapid differential hematology Färbelösungen, Dade Behring, Marburg). Für positive Ergebnisse wurde das Vorhandensein von Lymphoblasten gefordert, negative Ergebnisse waren dann gültig, wenn durch den Nachweis lebensfähiger kleiner Lymphozyten eine Zytotoxizität und eine Mitogenität der eingesetzten Antigenkonzentrationen ausgeschlossen werden konnte.

Die Resultate galten als valide, wenn die Hintergrundaktivität < 3000 cpm betrug, die positive Kontrolle einen $SI \geq 30$ aufwies und die oben beschriebenen Voraussetzungen für eine morphologische Bestätigung erfüllt waren.

Ergebnisse

LTT-MELISA® Ergebnisse bei 244 Patienten

Neunzig (36,9%) der anfangs getesteten 244 Patienten reagierten positiv auf ein ($n=39$) oder mehrere ($n=51$) rekombinante Borrelien-Antigene. Dabei waren Häufigkeit (%) und Stärke der Reaktion (Mittelwert $SI \pm$ Standardabweichung [SD]) für die verschiedenen Antigene unterschiedlich: OspA (6,5; $3,5 \pm 0,3$), OspC *B. garinii* (2,2; 10,6), OspC *B. afzelii* (13,5; $14,6 \pm 22,6$), p41 (10,2; $8,7 \pm 7,1$), p41-1 (29,2; $7,0 \pm 4,5$), p41-2 (5,0; $7,7 \pm 4,5$), p18 (11,0; $4,9 \pm 2,3$) und p100 (13,5; $4,9 \pm 2,1$). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die weiteren Testungen OspC (*B. afzelii*) als Marker für ein frühes Infektionsstadium ausgewählt [32, 36], p100 als Marker für eine späte Infektion [5, 31, 35] und die beiden internen p41-Fragmente aufgrund der höheren Spezifität verglichen mit dem kompletten p41-Antigen sowie der Möglichkeit, die beiden Genospezies *B. garinii* (p41-int 1) und *B. afzelii* (p41-int 2) zu differenzieren [32–34].

Von den 90 LTT-MELISA®-positiven Patienten standen für 65 serologische Daten zur Verfügung, 56 (86,2%) wiesen Antikörper gegen Borrelien im ELISA oder Western-

blot als Hinweis auf eine Borrelien-Infektion auf. Von diesen Patienten standen für 35 klinische Daten zur Verfügung, die Symptome EM, Gelenkschmerzen sowie chronische Arthritis wiesen auf Lyme-Krankheit hin. Von den neun LTT-MELISA®-positiven, aber seronegativen Patienten zeigten sieben eine Lyme-Symptomatik. Ein Patient war asymptomatisch, hatte aber einen Zeckenbiss 12 Tage vor Testung und wurde bei einem Follow-up nach Antibiotika-Therapie LTT-MELISA®-negativ gefunden. Für den neunten dieser Patienten standen keine klinischen Daten zur Verfügung.

Von den 154 (63,1%) LTT-MELISA®-negativen Patienten lag der Anteil der seropositiven Befunde mit 70% niedriger, das entspricht 65 von den 92 Patienten, für die serologische Daten vorlagen. Bei 87 Patienten lagen klinische Daten vor; hiervon waren zum Untersuchungszeitpunkt 58,6% symptomfrei (möglicherweise Spontanheilung oder Therapieerfolg), 41,4% zeigten uncharakteristische Symptome wie Kopfschmerz, Müdigkeit, Gelenk- und Muskelschmerzen, Ekzeme, Fazialisparese oder Burn out-Syndrom.

LTT-MELISA® Ergebnisse bei gesunden Kontrollprobanden

Die meisten seronegativen gesunden Probanden wurden wiederholt negativ gegen die verwendeten vier Borrelien-Antigene getestet (Tabelle 2). Drei Probanden reagierten einmalig schwach positiv ($SI=3,73; 4,43; 6,32$) in einer einzigen Verdünnung eines einzelnen Antigens, einer reagierte schwach positiv ($SI=3,91; 3,92$) auf je eine Verdünnung von zwei Antigenen. Aufgrund dessen wurde ein neuer, strengerer Cut-off wie folgt definiert: alle Ergebnisse $SI < 3$: negativ; Einzelreaktion mit $SI \geq 3$: indeterminant; mehrere Reaktionen mit $SI \geq 3$ (mehrere Verdünnungsstufen eines einzelnen Antigens oder Reaktionen mit mehreren Antigenen): positiv; mehrere Reaktionen mit $SI \geq 10$: stark positiv. Unter Anwendung dieses neuen Cut-offs war nur noch ein Proband positiv, die Spezifität des Tests betrug somit 96,7%.

Reproduzierbarkeit

Beurteilt nach dem neuen Cut-off waren zehn Patienten übereinstimmend positiv und 53 Patienten übereinstimmend negativ (Konkordanzrate 92,6%, 63 von 68). Bei den fünf diskordanten Probanden fanden sich neun der 11 abweichenden Werte im niedrig-positiven Bereich

Tabelle 2 Seronegative Kontrollpersonen ($n=30$) getestet in LTT-MELISA® für Lyme-Borreliose.

	rekombinante Borrelien-Antigene			
	OspC	p41-int 1	p41-int 2	p100
n	114	99	99	114
SI (Mittelwert \pm SD)	$1,09 \pm 0,86$	$0,79 \pm 0,54$	$0,81 \pm 0,59$	$0,74 \pm 0,47$
Ergebnisse $SI \geq 3$	3,91; 4,43; 6,32	3,73	3,92	0

n = Anzahl der Daten-Sätze (30 Personen getestet einmalig oder mehrmals gegen vier Antigene in je drei Verdünnungen).

SI = Stimulations-Index.

SD = Standardabweichung.

(SI von 3,32 bis 4,94); keine Diskordanz hatte einen stark positiven Wert mit einem $SI \geq 10$.

Alle fünf diskordanten Patienten hatten möglicherweise eine bestehende oder ausheilende LB, diese Annahme beruht auf der Anamnese kürzlicher Zeckenstiche gefolgt von klinischen Symptomen ($n=4$), grenzwertiger Serologie ($n=2$) oder eindeutig konkordanten LTT-MELISA®-Ergebnissen in vorherigen Tests vor Therapie ($n=1$).

Verlaufsstudien

Von 32 LTT-MELISA®-positiven (neuer Cut-off) Patienten mit klinischem Verdacht auf aktive LB konnten eine oder mehrere Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach Therapie gewonnen werden. Alle zeigten eine signifikante Verringerung der Lymphozytenreaktivität, fast immer begleitet von klinischer Besserung (Tabelle 3). Bei 25 Patienten wurden die Reaktionen auf alle getesteten Antigene negativ (typische Beispiele in Abbildung 1A,B,C). Der Zeitraum der Entwicklung bis zu einem komplett negativen Testausfall variierte dabei von „während Therapie“ bis zu einem Jahr, üblicherweise wurden Zeiträume von vier bis acht Wochen nach Ablauf der Therapie gefunden. Bei den übrigen sieben Patienten waren zwar positive Reaktionen noch nachweisbar, jedoch in wesentlich schwächerem Ausmaß als vor Therapie (typische Beispiele in Abbildung 1D,E).

In ähnlicher Weise wurden 17 von 22 LTT-MELISA®-indeterminanten, aber symptomatischen Patienten mit Verdacht auf LB nach Therapie negativ (typisches Beispiel in Abbildung 1F), fünf verhielten sich im LTT im Wesentlichen unverändert (Tabelle 3).

Diskussion

Die vorliegende Untersuchung beschreibt die Entwicklung, Spezifität, Reproduzierbarkeit und klinische Relevanz eines in zwei Punkten verbesserten neuen LTT im Rahmen der Diagnostik der LB.

Zum einen wurde ein standardisierter, validierter LTT angewendet. Seit seiner Entwicklung in den achtziger Jahren konnte für die LTT-MELISA®-Modifikation eine im Vergleich zum herkömmlichen LTT verbesserte Sensitivität und Spezifität zum Nachweis von Metallsensibilisierungen belegt werden, bedingt durch eine höhere Zahl von Lymphozyten pro Ansatz (1×10^6), die Verwendung von vorselektiertem, nichtmitogenen gepoolten Human-

serum, nichtmitogene und nichtzytotoxische Antigenkonzentrationen und eine verringerte Anzahl von Monozyten [19, 23, 28]. Darüber hinaus wurde die Qualität dadurch verbessert, dass die radioaktive Analytik durch eine morphologische Beurteilung der eingesetzten Zellen ergänzt wird, um sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse zu vermeiden [23]. Die technische Validität und die klinische Relevanz beim Nachweis und Monitoring der Sensibilisierung auf Medikamente und andere Arzneimittel sowie Schwermetalle ist ausführlich dokumentiert [19–22, 24–30]. Diese Studie beschreibt erstmals die Anwendung des LTT-MELISA® zum Nachweis zellulärer Immunreaktivität auf infektiöse Krankheitserreger.

Die zweite Verbesserung betrifft die Verwendung ausschließlich gut charakterisierter, rekombinanter Borrelien-Antigene, die auch in kommerziellen serologischen Tests zum Einsatz kommen. In den meisten bisherigen Studien dienten als Antigenquellen Bakterienlysate oder Kulturüberstände. Derartige Quellen enthalten nicht nur bekannte mitogene Substanzen (z.B. Lipopolysaccharide) und eine Vielzahl antigener Epitope, sondern schliessen auch *in vivo* exprimierte Antigene aus, von denen kürzlich gezeigt werden konnte, dass sie zur Verbesserung der serologischen Diagnostik beitragen [35–37]. Durch die Benutzung rekombinanter Antigene im LTT kann daher eine unspezifische Hintergrundproliferation vermindert und gleichzeitig die Spezifität und klinische Relevanz der Ergebnisse verbessert werden. Andererseits stellte sich in zwei neueren Studien mit ausschließlich rekombinanten Antigenen die Spezifität zwar verbessert, aber immer noch problematisch dar [38, 39]. Offensichtlich ist der Einsatz rekombinanter Antigene zusammen mit einem optimierten LTT von Wichtigkeit.

Da die vier für diese Studie gewählten Antigene von *B. afzelii* und *B. garinii* abgeleitet sind, nicht jedoch von *B. burgdorferi* sensu stricto, ist die Relevanz des Einsatzes zum LB-Nachweis in Ländern mit geringem oder fehlendem Vorkommen von *B. afzelii* oder *B. garinii* (z.B. USA) unklar. Bei 124 Tests an Patienten geografischer Herkunft unter Ausschluss Deutschlands waren 40 reaktiv, darunter Patienten aus England ($n=28$), Luxemburg ($n=4$), Schweiz ($n=2$), Frankreich ($n=2$), Österreich ($n=1$), Niederlande ($n=1$) sowie USA ($n=2$) (Daten unveröffentlicht). Die Ergebnisse der letzten beiden Patienten unterstützen möglicherweise die diagnostische Relevanz für die USA, allerdings lag die Infektionsquelle möglicherweise auch außerhalb der USA, da es sich um Viel-

Tabelle 3 LTT-MELISA® Reaktivität vor und nach antibiotischer Therapie ($n=54$).

vor Therapie	nach Therapie		
	negativ	niedriger	unverändert
positiv ($n=32$)	25	7	0
indeterminant ($n=22$)	17	0	5

positiv: mehrfache Reaktionen von $SI \geq 3$.

indeterminant: einfache Reaktion von $SI \geq 3$.

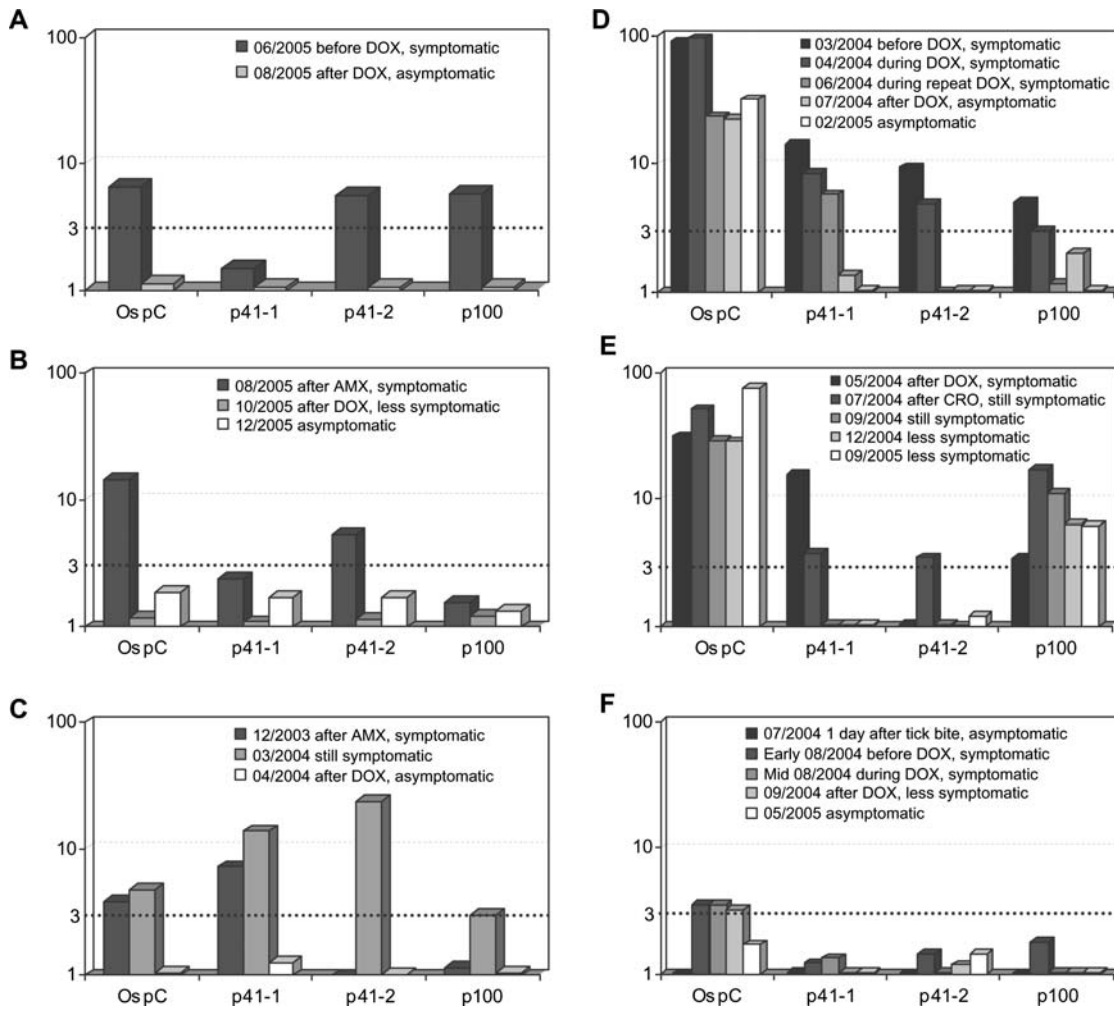


Abbildung 1 Lymphozyten-Reaktivität gegen rekombinante Borrelien-Antigene in Patienten vor und nach Therapie für Lyme-Borreliose, (DOX: Doxycyclin, AMX: Amoxicillin, CRO: Ceftriaxon), X-Achse: 4 rekombinante Borrelien-Antigene, Y-Achse: SI. (A) Patient 1 (48 Jahre, männlich). 2005: Zeckenstich, EM, Gelenkschmerzen, Verdacht auf Neuroborreliose, seropositiv (IgM ±, WB +; IgG 130, WB +). Juni 2005: erster LTT-MELISA® positiv für 3 von 4 getesteten Antigenen, Behandlung mit Doxycyclin. August 2005: zweiter LTT-MELISA® negativ auf alle 4 getesteten Antigene, seropositiv (IgM-, WB +; IgG 65, WB +), Patient asymptomatisch. (B) Patient 2 (58 Jahre, weiblich). Frühjahr 2005: Zeckenstich, großes EM bei bestehender Fibromyalgie, seropositiv (IgM +, WB +; IgG 17, WB +), im Juni 3 Wochen Amoxicillin. August 2005: erster LTT-MELISA® positiv auf 2 von 4 Antigenen, weiterhin Symptome, Doxycyclintherapie. Oktober 2005: zweiter LTT-MELISA® negativ auf alle 4 Antigene, Symptomatik verringert. Dezember 2005: dritter LTT-MELISA® erneut negativ auf alle 4 Antigene, seropositiv (IgM +, WB +; IgG 10, WB +), Einschätzung einer ausgeheilten LB bei fortbestehender Fibromyalgie. (C) Patient 3 (44 Jahre, weiblich). Sommer 2003: Zeckenstich, EM, Gelenkschmerzen, Taubheit in 2 Fingern. August 2003: seropositiv (IgM +, WB +; IgG-), Behandlung mit Amoxicillin, Verschwinden des EM bei fortbestehenden Gelenkschmerzen. Dezember 2003: erster LTT-MELISA® positiv auf 2 von 3 Antigenen (p41-2 nicht getestet). März 2004: zweiter LTT-MELISA® positiv auf alle 4 Antigene, weiterhin Gelenkschmerzen. April 2004: Behandlung mit Doxycyclin, Verschwinden der Gelenkschmerzen, dritter LTT-MELISA® komplett negativ. (D) Patient 4 (39 Jahre, männlich). 2003: fraglicher Zeckenstich, Schmerzen, Schwellung des linken Fußes. Februar 2004: seropositiv (IgM-; IgG 100, WB +). März 2004: erster LTT-MELISA® stark positiv auf alle 4 Antigene, HLA B27 positiv getestet. April 2004: weiterhin Symptomatik, Beginn einer Doxycyclintherapie, zweiter LTT-MELISA® positiv auf 3 von 4 Antigenen. Juni 2004: Fortsetzung der Doxycyclintherapie für 3 Monate, dritter LTT-MELISA® positiv auf 2 von 4 Antigenen. Juli 2004: nahezu symptomfrei, Serologie IgM-; IgG 88, WB +, vierter LTT-MELISA® positiv nur auf OspC. Februar 2005: symptomfrei, fünfter LTT-MELISA® noch positiv auf OspC (zelluläre Restaktivität?). (E) Patient 5 (44 Jahre, weiblich). März 2004: Zeckenstich, EM, Gelenk- und Muskelschmerzen, seropositiv (IgM ++, WB +; IgG 27, WB-), daraufhin Behandlung mit Doxycyclin. Mai 2004: erster LTT-MELISA® positiv auf 3 von 4 Antigenen. Mai bis Juli 2004: Ceftriaxontherapie i.v. Juli 2004: zweiter LTT-MELISA® positiv auf alle 4 Antigene. September 2004: dritter LTT-MELISA® positiv auf OspC und p100. Dezember 2004: vierter LTT-MELISA® unverändert, Symptomatik verringert. September 2005: fünfter LTT-MELISA® weiterhin unverändert positiv auf OspC und p100, serologisch unklar (IgM-, WB +; IgG-, WB-), Gelenk- und Muskelschmerzen nachlassend, aber Patient berichtet Nervosität, Schlafstörungen, Tinnitus. (F) Patient 6 (47 Jahre, männlich). 7. Juli 2004: Zeckenstich. 8. Juli 2004: erster LTT-MELISA® negativ, seronegativ, keine Klinik. 9. August 2004: EM, zweiter LTT-MELISA® indeterminant auf OspC, seropositiv (IgM +, WB +; IgG-), daraufhin 3 Wochen Doxycyclin. 17. August 2004: dritter LTT-MELISA® unverändert, fortbestehendes EM. 1. September 2004: vierter LTT-MELISA® und Serologie unverändert, EM nahezu verschwunden. Mai 2005: fünfter LTT-MELISA® komplett negativ, seronegativ, Patient symptomfrei.

reisende handelte. Eine Studie an LB-Patienten innerhalb der USA sollte zur Klärung dieser wichtigen Frage dienen.

Die meisten der positiven LTT-MELISA®-Befunde der anfänglich getesteten 244 Patienten waren seropositiv und symptomatisch. Das unterstreicht die gute Korrelation zwischen zellulärer Reaktivität und Borrelien-Infektion bzw. LB. Allerdings waren auch neun Lymphozyten-reaktive Patienten seronegativ. Sieben von ihnen wiesen charakteristische klinische Symptome für LB auf und gehören zu den kontrovers diskutierten „seronegativen LB-Patienten“, über die frühere LTT-Studien, besonders von Dattwyler et al. [8] berichten. Die möglichen Ursachen für die Seronegativität reichen dabei von Immunsuppression, verzögerter humoraler Immunantwort, Antikörpersequestrierung bis hin zu ungeeigneten Testsystemen [2, 5, 6]. Das letztere Argument wird durch unsere Beobachtungen unterstützt, dass es in der Tat ELISA-negative Patienten gibt, die im Westernblot positiv reagieren (unveröffentlichte Daten; siehe auch Patienten eins und fünf). Das derzeit praktizierte Zwei-Stufen-System wird Infektionen bei derartigen Patienten nicht erkennen, da der Westernblot nur bei positiven oder grenzwertigen Testausfällen durchgeführt wird. ELISA-negative Personen mit klinischem Verdacht auf LB sollten daher, außer bei Vorliegen des eindeutigen EM, im Westernblot oder in einem optimierten LTT untersucht werden.

Aufgrund der Ergebnisse der Kontrollpersonen wurde ein neuer „Arbeits“-Cut-off festgelegt (Patient gilt nur als positiv bei mehrmals einer Reaktion mit $SI \geq 3$) in Anlehnung an den Cut-off für den Beryllium-Lymphozyten-Proliferations-Test (Be-LPT) [40, 41]. Die hohe erreichte Spezifität von 96,7% steht im Gegensatz zu den eher niedrigen Spezifitäten bisheriger Studien und unterstreicht die Bedeutung einer optimierten LTT-Durchführung mit einem angemessenen Cut-off und definierten rekombinanten Antigenen. „Indeterminante“ Patienten (nur eine Reaktion mit $SI \geq 3$) können entweder „falsch positiv“ sein oder eine echte, sehr niedrige zelluläre Reaktivität besitzen, sie sollten wiedertestet werden. Wiederholt indeterminate Testausfälle scheinen die Diagnose LB zu unterstützen. Patient sechs in unserer Studie zum Beispiel hatte eine klassische frühe LB mit EM und Serokonversion, die Testung fiel aber in drei Blutproben indeterminant aus. Der Patient wurde LTT-MELISA®-negativ, seronegativ und symptomfrei nach antibiotischer Therapie.

Die gute Reproduzierbarkeit von 92,6% bei 68 Wiederholungsmessungen belegt die Zuverlässigkeit des verwendeten Testsystems. Wiederholungsmessungen wurden bewusst auf verschiedenen Platten durchgeführt, um den Einflüssen der vielfältigen manuellen Arbeitsschritte Rechnung zu tragen. Die oben beschriebenen fünf „diskordanten“ Patienten zeigen mit ihren niedrigen Reaktionsraten die für viele Labortests typische Grauzone. Eine ähnlich hohe Reproduzierbarkeitsrate von 94% wurde für den LTT-MELISA® auch beim Nachweis

der Metallsensibilisierung gezeigt [28], vergleichbare Daten für andere LTT waren bisher dagegen nicht vorhanden. Kürzlich wurde in einer ausführlichen Analyse von Ergebnissen des Be-LPT für gesplittete Proben zwischen verschiedenen Labors eine Übereinstimmung von 64,7% gezeigt, die Übereinstimmung innerhalb eines Labors betrug bis zu 91,9% [41].

Während die Sensitivität des LTT-MELISA® in der vorliegenden Studie aufgrund des Fehlens kultureller oder PCR-Ergebnisse statistisch nicht ausgewertet werden konnte, wurde die klinische Relevanz zur Identifizierung von Patienten, die von einer antibiotischen Therapie profitieren können, klar belegt. Eine große Mehrheit von symptomatischen Patienten mit lymphozytärer Reaktivität wies nach ein oder zwei Therapiezyklen eine erhebliche Reduktion der Reaktivität einhergehend mit klinischer Besserung auf. Die sieben Patienten, die nach Therapie noch, wenn auch vermindert, reaktiv waren (e.g. Patienten vier und fünf), hatten möglicherweise noch nicht alle Gedächtniszellen abgebaut. In ähnlicher Weise könnten die fünf „indeterminanten“ Patienten, die sich zunächst unverändert verhielten, mit der Zeit noch eine Reduktion zeigen, eventuell sind sie aber therapieresistent. Außerdem können Reinfektionen oder andere Ursachen für ihren klinischen Zustand nicht ausgeschlossen werden. Die Kinetik der humoralen und der zellulären Immunantwort unterscheidet sich deutlich, so vermindert sich die T-Zell-Reaktivität bei den meisten Patienten wesentlich schneller als die Antikörpertiter. Daher könnten die mit dem hier vorgestellten System ermittelten Ergebnisse einen frühen Marker für den therapeutischen Erfolg darstellen. Ebenso wäre eine persistierende Zellreaktivität nach Therapie (z.B. Patienten zwei bis fünf) möglicherweise eine Indikation für einen zweiten Therapiezyklus oder einen Antibiotikawechsel. Verminderte, aber nicht negative Lymphozytenreaktivität nach Therapie wurde für drei Fälle von Breier et al. [16] und in sechs Fällen von Kraus et al. [10] berichtet, jedoch nicht für die meisten der 39 Fälle, die Vaz et al. [42] untersuchte. Erklärungen für die Diskrepanz der Daten in der letzteren Studie liegen wahrscheinlich in wesentlichen Unterschieden der Methode, der Testdurchführung und des angewandten Cut-offs.

Wegen der Komplexität von Lymphozyten-Proliferations-Tests und insbesondere auch der kontroversen Diskussion um deren Einsatz zur LB-Diagnostik empfehlen wir, den hier beschriebenen LTT-MELISA® oder in den Qualitätsmerkmalen vergleichbare Tests nur in akkreditierten Laboratorien mit ausreichender Zellkulturexpertise durchzuführen. Diese sollten ihre eigenen „Arbeits“-Cut-off-Werte zur Definition positiver Patienten erarbeiten, in regelmäßigen Abständen sorgfältige Qualitätskontrollen durchführen und ihre Ergebnisse im Zusammenhang mit den erhältlichen anamnestischen, klinischen und serologischen Daten beurteilen. Bei Berücksichtigung dieser Bedingungen stellen der LTT-MELISA® oder gleichwertige LTT hervorragende Hilfsmittel dar zur Abklärung sero-

logisch und klinisch nicht eindeutiger Fälle von LB und, falls erforderlich, zur Überprüfung des Therapieerfolges.

Danksagung

Die Autoren bedanken sich für exzellente technische Assistenz bei Gudrun Emmermacher, Ursel Köster und Bianca Schüttelpelz für die LTT-MELISA® Testung und bei Barbara Rose und Christel Wüsten für die serologischen Analysen. Unser Dank gilt auch den Patienten und Ärzten für ihren Beitrag zu dieser Studie.

Literatur

- Centers for Disease Control and Prevention. Lyme disease—United States, 2001–2002 Morb Mortal Wkly Rep 2004;53:365–9.
- Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis. Lancet 2003;362:1639–47.
- Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. J Clin Invest 2004;113:1093–101.
- Robertson J, Guy E, Andrews N, Wilske B, Anda P, Granström M, et al. A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. J Clin Microbiol 2000;38:2097–02.
- Wilske B. Review: diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. Vector-Borne and Zoonotic Dis 2003;3:215–27.
- Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme borreliosis. Clin Microbiol Rev 2005;18:484–09.
- Dumler JS. Molecular diagnosis of Lyme disease: review and meta-analysis. Mol Diagn 2001;6:1–11.
- Dattwyler RJ, Volkman DJ, Luft BJ, Halperin JJ, Thomas J, Golightly MG. Seronegative Lyme disease. Dissociation of specific T- and B-lymphocyte responses to *Borrelia burgdorferi*. N Engl J Med 1988;19:1441–6.
- Dressler F, Yoshinari NH, Steere AC. The T-cell proliferative assay in the diagnosis of Lyme disease. Ann Intern Med 1991;115:533–9.
- Krause A, Brade V, Schoerner C, Sollbach W, Kalden JR, Burmester GR. T cell proliferation induced by *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. Autologous serum required for optimum stimulation. Arthritis Rheum 1991;34:393–402.
- Yoshinari NH, Reinhardt BN, Steere AC. T cell responses to polypeptide fractions of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme arthritis. Arthritis Rheum 1991;34:707–13.
- Zoschke DC, Skemp AA, Defosse DL. Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease. Ann Intern Med 1991;114:285–89.
- Krause A, Burmester GR, Rensing A, Schoerner C, Schaible UE, Simon MM, et al. Cellular immune reactivity to recombinant OspA and flagellin from *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. J Clin Invest 1992;90:1077–84.
- Schempp C, Owsianowski M, Lange R, Gollnick H. Comparison of *Borrelia burgdorferi* ultra-sonicate and whole *B. Burgdorferi* cells as a stimulus for T-cell proliferation and GM-CSF secretion in vitro. Zentralbl Bakteriell 1993;279:417–25.
- Roessner K, Fikrig E, Russell JQ, Cooper SM, Flavell RA, Budd RC. Prominent T lymphocyte response to *Borrelia burgdorferi* from peripheral blood of unexposed donors. Eur J Immunol 1994;24:320–4.
- Breier F, Klade H, Stanek G. Lymphozytenproliferationstest bei kutanen Manifestationen der Lyme-Borreliose. Wien med Wschr 1995;27:170–3.
- Huppertz H-I, Mösbauer S, Busch DH, Karsch H. Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in the diagnosis of Lyme arthritis in children and adults. Eur J Pediatr 1996;155:297–302.
- Rutkowski S, Busch DH, Huppertz H-I. Lymphocyte proliferation assay in response to *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme arthritis: analysis of lymphocyte subsets. Rheumatol Int 1997;17:151–8.
- Stejskal VDM, Cederbrant K, Lindvall A, Forsbeck M. MELISA – an in vitro tool for the study of metal allergy. Toxicol In Vitro 1994;8:991–1000.
- Stejskal VDM, Olin RG, Forsbeck M. The lymphocyte transformation test for diagnosis of drug-induced occupational allergy. J Allergy Clin Immunol 1986;77:411–26.
- Stejskal VDM, Forsbeck M, Nilsson R. Lymphocyte transformation test for diagnosis of isothiazolinone allergy in man. J Invest Dermatol 1990;94:798–802.
- Stejskal VDM, Forsbeck M, Cederbrant K, Astemann O. Mercury-specific lymphocytes: an indication of mercury allergy in man. J Clin Immunol 1996;16:31–40.
- Stejskal VDM, Danersund A, Lindvall A, Hudecek R, Nordmann V, Yaqob A, et al. Metal-specific lymphocytes: biomarkers of sensitivity in man. Neuroendocrinol Lett 1999;20:289–98.
- Tibbling L, Thoumas K-A, Lenkei R, Stejskal VDM. Immunological and brain MRI changes in patients with suspected metal intoxication. Intl J Occupat Med Toxicol 1995;4:285–94.
- Stejskal VDM. Human hapten-specific lymphocytes: biomarkers of allergy in man. Drug Inform J 1997;31:1379–82.
- Sterzl I, Prochazkova J, Hrda P, Bartova J, Matucha P, Stejskal VDM. Mercury and nickel allergy: risk factors in fatigue and autoimmunity. Neuroendocrinol Lett 1999;20:221–28.
- Regland B, Zachrisson O, Stejskal V, Gottfries C-G. Nickel allergy is found in a majority of women with chronic fatigue syndrome and muscle pain – and may be triggered by cigarette smoke and dietary nickel intake. J Chron Fatigue Synd 2001;8:57–65.
- Valentine-Thon E, Schiwara H-W. Validity of MELISA® for metal sensitivity testing. Neuroendocrinol Lett 2003;24:57–64.
- Prochazkova J, Sterzl I, Kucerova H, Bartova J, Stejskal VDM. The beneficial effect of amalgam replacement on health in patients with autoimmunity. Neuroendocrinol Lett 2004;25:211–18.
- Kakuschke A, Valentine-Thon E, Griesel S, Fonfara S, Siebert U, Prange A. Immunological impact of metals in harbor seals (*Phoca vitulina*) of the North Sea. Environ Sci Technol 2005;39:7568–75.
- Jauris-Heipke S, Fuchs R, Hofmann A, Lottspeich F, Preac-Mursic V, Soutschek E, et al. Molecular characterization of the p100 gene of *Borrelia burgdorferi* strain pKo. FEMS Microbiol Lett 1993a;114:235–42.
- Jauris-Heipke S, Fuchs R, Motz M, Preac-Mursic V, Schwab E, Soutschek E, et al. Genetic heterogeneity of the genes coding for the outer surface protein C (OspC) and the flagellin of *Borrelia burgdorferi*. Med Microbiol Immunol 1993b;182:37–50.
- Luft BJ, Dunn JJ, Dattwyler RJ, Gorgone G, Gorevic PD, Schubach WH. Cross-reactive antigenic domains of the flagellin protein of *Borrelia burgdorferi*. Res Microbiol 1993;144:251–7.
- Robinson JM, Pilot-Matras TJ, Pratt SD, Patel CB, Bevirt

- TS, Hunt JC. Analysis of the humoral response to the flagellin protein of *Borrelia burgdorferi*: cloning of regions capable of differentiating Lyme disease from syphilis. *J Clin Microbiol* 1993;31:629–35.
35. Wilske B, Fingerle V, Herzer P, Hofmann A, Lehnert G, Peters H, et al. Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. *Med Microbiol Immunol* 1993a; 182:255–70.
 36. Wilske B, Preac-Mursic V, Jauris S, Hofmann A, Pradel I, Soutschek E, et al. Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 1993b;61: 2182–91.
 37. Schulte-Spechtel U, Lehnert G, Liegl G, Fingerle V, Heimerl C, Johnson B, et al. Significant improvement of the recombinant *Borrelia*-specific immunoglobulin G immunoblot test by addition of VlsE and a DbpA homologue derived from *Borrelia garinii* for diagnosis of early neuroborreliosis. *J Clin Microbiol* 2003;41:1299–303.
 38. Bauer Y, Hofmann H, Jahraus O, Mytilineos J, Simon MM, Wallich R. Prominent T cell response to a selectively in vivo expressed *Borrelia burgdorferi* outer surface protein (pG) in patients with Lyme disease. *Eur J Immunol* 2001;31:767–76.
 39. Kalish RS, Wood JA, Golde W, Bernard R, Davis LE, Grimson RC, et al. Human T lymphocyte response to *Borrelia burgdorferi* infection: no correlation between human leukocyte function antigen type 1 peptide response and clinical status. *J Infect Dis* 2003;187:102–8.
 40. United States Department of Energy. In: Wambach PW, editor. DOE-SPEC 1142-2001: Beryllium lymphocyte proliferation testing. Washington, D.C., US Department of Energy, 2001.
 41. Stange AW, Furman FJ, Hilmas DE. The beryllium lymphocyte proliferation test: relevant issues in beryllium health surveillance. *Am J Indust Med* 2004;46:453–62.
 42. Vaz A, Glickstein L, Field JA, McHugh G, Sikand VK, Damle N, et al. Cellular and humoral immune response to *Borrelia burgdorferi* antigens in patients with culture-positive early Lyme disease. *Infect Immun* 2001;69:7437–44.