



Lymphozytentransformationstest (LTT) und CD57-Nachweis: *Bestimmung der zellulären Immunreaktion im Blut zur Diagnostik der aktiven Lyme-Borreliose*

Mit geschätzt 60.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland ist die Lyme-Borreliose die häufigste durch Zecken übertragene Infektionserkrankung. Auslöser ist die Spirochäte *Borrelia burgdorferi*, die 1982 erstmals beschrieben wurde. Heute sind vier Unterarten bekannt (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. b. afzelii*, *B. b. garinii* und *B. b. spielmanii*), die beim Menschen Erkrankungen hervorrufen. Das klinische Bild ist durch einen stadienförmigen Verlauf gekennzeichnet und reicht vom Erythema migrans, weiteren dermatologischen und rheumatologischen Symptomen bis zu neurologischen und kardialen Krankheitserscheinungen.

Labordiagnostik

Die klassische Labordiagnostik der Lyme-Borreliose besteht aus serologischen Tests zum Antikörpernachweis, bei denen IgG- und IgM-Antikörper im ELISA und Immunoblot nachgewiesen werden. Diese bewährte Stufendiagnostik hat allerdings auch ihre Einschränkungen:

- In der Frühphase der Erkrankung sind oftmals über Wochen hinweg überhaupt noch keine oder aber noch keine eindeutig verwertbaren Antikörper nachweisbar. Umgekehrt bleiben einmal ausgebildete Antikörper auch nach Ausheilung lange unverändert nachweisbar.
- Bei chronischen Verläufen ist eine starke Antikörperreaktion zwar praktisch immer vorhanden, diese bleibt aber sehr häufig nach spontaner Ausheilung und auch nach erfolgreicher antibiotischer Therapie über einen langen Zeitraum erhalten. Sowohl die Einschätzung einer aktuell bestehenden Aktivität

als auch die Dokumentation eines Behandlungserfolges sind in solchen Fällen schwierig.

- Falsch positive Reaktionen können z. B. bei Autoimmunerkrankungen, bakteriellen (insbesondere Syphilis) und einigen viralen Infektionen (z.B. EBV) auftreten.

Lymphozytentransformationstest LTT

Verbesserungen in dieser Situation verspricht der Lymphozytentransformationstest (LTT) für Borrelien. Beim LTT wird die Aktivierung und anschließende Vermehrung sensibilisierter Patienten-Lymphozyten in Laborkulturen nach Inkubation mit Borrelien-Antigenen gemessen. Ein positiver Reaktionsausfall deutet auf eine aktuelle, Borrelien-spezifische Aktivierung des zellulären Immunsystems hin.

Bei Frischinfektionen ist eine Lymphozytenaktivierung oftmals schon deutlich vor einer Antikörperantwort vorhanden, klingt aber nach Aus-

heilung einer akuten oder chronischen Borreliose auch schneller wieder ab. In Ergänzung zu den serologischen Tests kann damit der LTT wichtige Zusatzinformationen bei der Einschätzung einer Borrelieninfektion, der Bewertung der Aktivität und einer eventuellen Therapiebedürftigkeit liefern.

Der Einsatz hochgereinigter, klar definierter, rekombinanter Schlüsselantigene erlaubt die Erkennung der Lymphozytenaktivierung unabhängig vom Krankheitsstadium und hilft, unspezifische, falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wie sie bei sog. Vollantigenen zu befürchten sind. Die Antigenauswahl deckt alle humanpathogenen Borrelien ab. Jedes Antigen wird in mehreren Verdünnungen verwendet, um noch höhere Sicherheit in der Aussage zu gewinnen. Positiv- und Negativkontrollen in jedem Ansatz gewährleisten die zuverlässige Erkennung der Stimulierbarkeit der Patientenlymphozyten, aber auch einer evtl. vorhandenen unspezifischen Aktivierung.

Typische Indikationen für den Borrelien-LTT

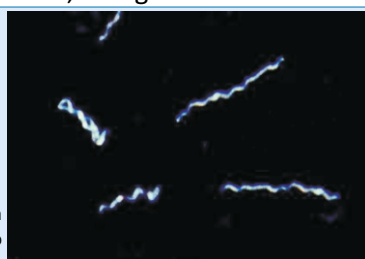
- Verdacht auf aktive Infektion mit unklarer Serologie (bei V. a. Frischinfektion auch bei negativen Borrelien-Antikörpern)



Übertragung der Infektion:

Saugende Zecke

Borrelia burgdorferi im Dunkelfeldmikroskop

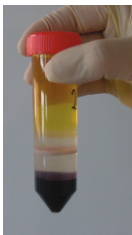


- Unterscheidung zwischen einer chronischen und einer ausgeheilten Infektion bei positivem Antikörperbefund (Abb. 3 und 4)
- Objektiv dokumentierte Erfolgskontrolle nach Antibiotikatherapie (Abb. 5a und 5b)

Untersuchungsmaterial

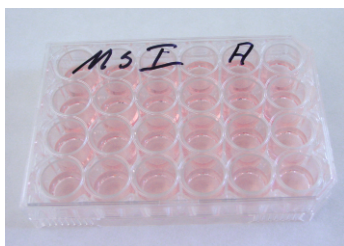
20 ml Blut in CPDA- oder ACD-Spezialröhrchen (Bitte nicht kühlen, Probe am Entnahmetag einsenden, Versanddauer < 48 Stunden). Das Blutabnahme- und Versandmaterial wird Ihnen von unserem Labor (Fon (0421) 2072-199) kostenfrei zur Verfügung gestellt.

Durchführung des LTT



Isolierung der Lymphozyten aus Patientenblut durch Dichtegradientenzentrifugation.

Inkubation der Lymphozyten unter Zugabe von definierten Borrelien-Antigenen für 5Tage in der Zellkultur.



Messung der antigeninduzierten Lymphozytenaktivierung und -vermehrung durch ³H-Thymidineinbau und mikroskopische, morphologische Begutachtung der Lymphoblaststransformation.



LTT-Ergebnisse bei gesunden Blutspendern, Infizierten und Erkrankten

Abb. 1 Seronegative, klinisch unauffällige Probanden

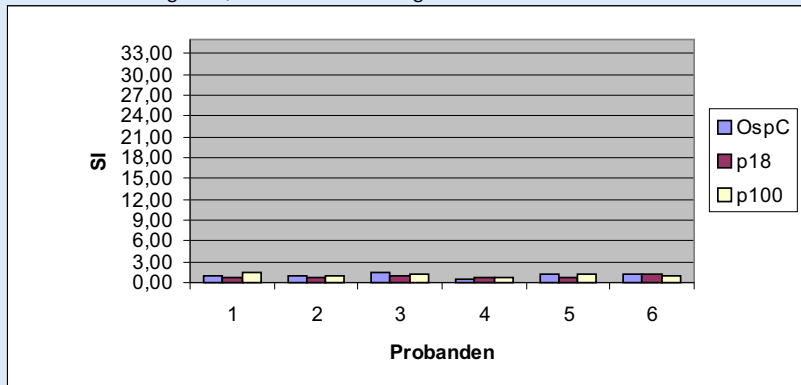
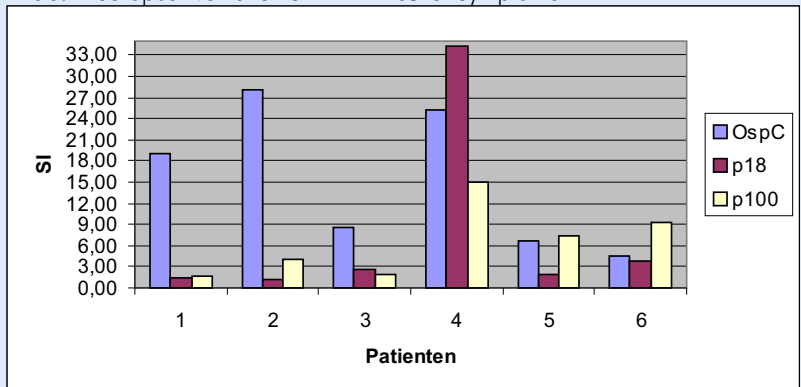


Abb. 2 Seropositive Patienten mit klinischer Symptomatik



Patienten 1-3: frische Borrelieninfektion
Patienten 4-6: chronische Borrelieninfektion

Abb. 3 Seropositive Patienten ohne klinische Symptomatik

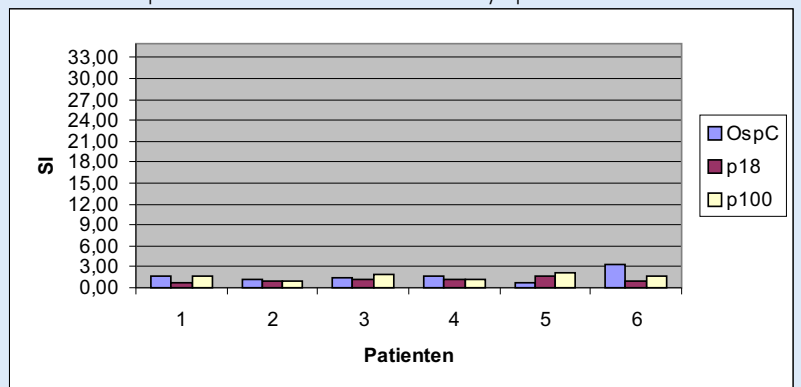
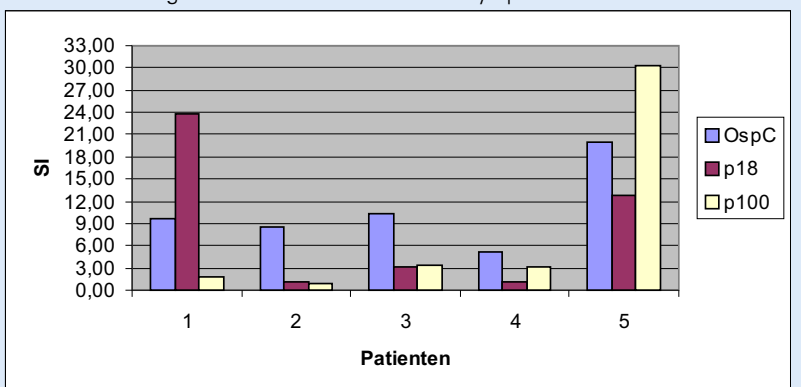


Abb. 4 Seronegative Patienten mit klinischer Symptomatik einer Neuroborreliose



Borrelien-LTT zur Therapiekontrolle

Abb.5a Vor Therapie

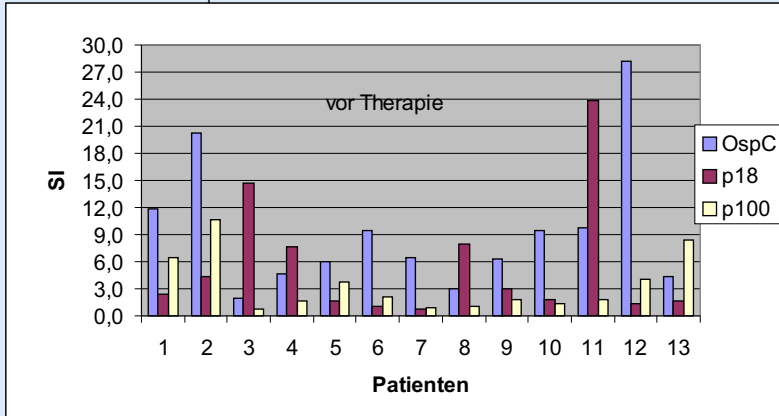
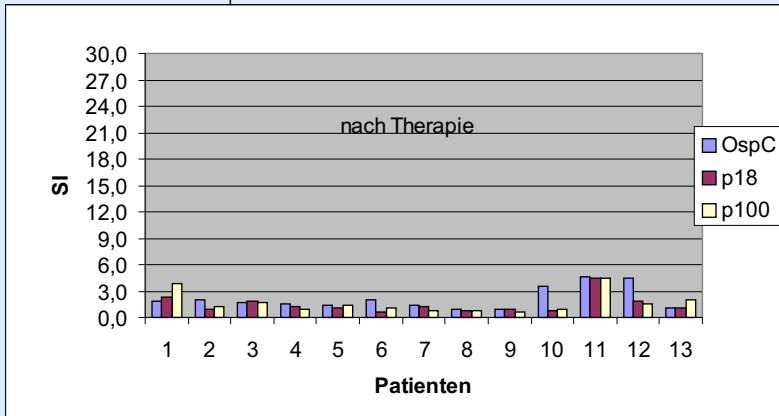


Abb.5b Nach Therapie



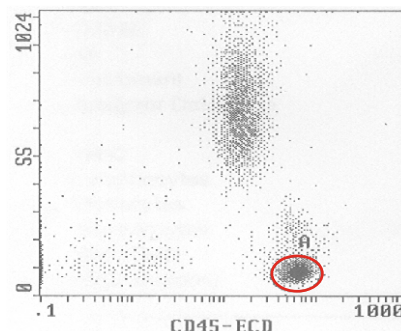
CD57-Test bei chronischer Lyme-Borreliose

Klinische Studien und Fallbeobachtungen deuten darauf hin, dass chronische Borrelieninfektionen mit Veränderungen in der zellulären Immunabwehr einhergehen können. Ein Anzeichen hierfür kann eine verminderte Anzahl der sogenannten "Natürlichen Killerzellen" (natural killer cells, NK; CD3-CD56+), vor allem aber eine verringerte Absolutzahl und Anteil der aktivierten NK-Zellen (CD3-CD56+CD57+) sein.

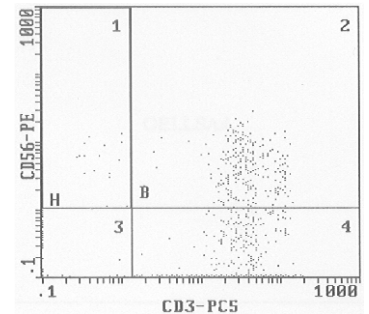
Für eine zuverlässige Aussage bei der CD57-Bestimmung ist es wichtig, dass bei der Analyse wirklich nur die Natural-Killer-Zellen erfasst werden und der Test nicht durch andere im Überschuss vorhandene Zellen, wie z. B. T-Lymphozyten, verfälscht wird. In unserem Labor werden deshalb die Blutzellen in einem aufwendigen

Verfahren vorpräpariert und in einem mehrstufigen Gating-Prozess durch vier verschiedene monoklonale Antikörper (CD45, CD3, CD56, CD57) charakterisiert, ehe die Auswertung vorgenommen wird. Auf diese Weise wird höchste Spezifität des Befundes gewährleistet.

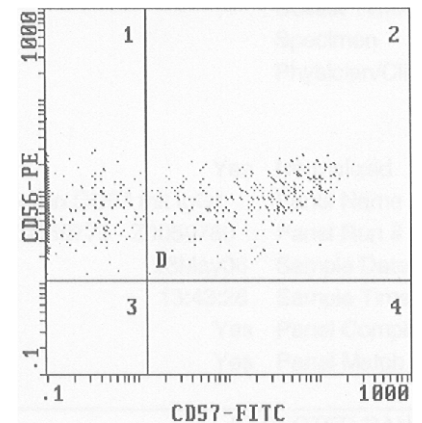
1. Gewinnung der gesamten weißen Blutkörperchen und Abtrennung von Blutplättchen, Resten der roten Blutkörperchen etc.: CD45-positiv (rot umrandetes Feld A)



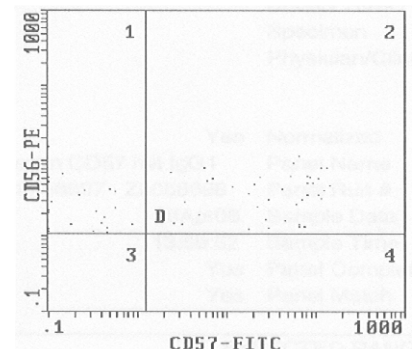
2. Abtrennung der NK-Zellen (CD56-positiv, aber CD3-negativ) von den Gesamt-T-Lymphozyten (CD3-positiv): Punktwolke im Feld H1



3. Nachweis des CD57-positiven Anteils an den CD56-positiven NK-Zellen: Punktwolke im Feld D2;
 - a. Normalbefund: 383 Zellen/ μ l (CD45+CD3-CD56+CD57+) bei einem Gesunden.



- b. Deutliche niedrigere Wert: nur 42 Zellen/ μ l (Cd45+ CD3-CD56+CD57+) bei einem Patienten mit chronischer Borreliose.



Während bei akuter Lyme-Borreliose und anderen Erkrankungen normale CD57-Werte gemessen wurden, wiesen in Literaturberichten Patienten mit chronischer Borrelioseninfektion häufiger Werte unter 60 CD57+-Zellen/ μ l Blut auf. Es wurde diskutiert, dass es zu einer Unterdrückung des Immunsystems durch die Borrelioseninfektion selbst kommt, welche die Ausheilung verzögert und behindert. Es ist aber auch denkbar, dass manche Menschen von Natur aus über ein weniger starkes Immunsystem verfügen und deshalb ein erhöhtes Risiko einer chronifizierten Borrelioseninfektion davontragen. Die beschriebenen Veränderungen wurden in stärkerem Maße bei Patienten mit Befall des Nervensystems beobachtet als bei Befall des Weichteil- und Skelettsystems. Die CD57-Verminderung hielt so lange an, bis durch antibiotische und andere Therapien eine Ausheilung erreicht werden konnte.

Im Umkehrschluss wurde eine verringerte CD57-Zahl als messbares Signal einer aktiven, chronischen Borrelioseninfektion und möglicher Indikator des Therapieerfolgs angesehen: eine Borrelioseninfektion wurde dann als erfolgreich angesehen, wenn es zu einer Erholung der CD57-Zahlen kam. Zu Beginn einer Behandlung erniedrigte CD57-Werte können auch einen Hinweis darauf geben, dass evtl. eine höher dosierte und längere Antibiotikatherapie erforderlich ist.

Der CD57-Test ergänzt in seiner Aussage die klassische Bestimmung der IgG und IgM-Antikörper in ELISA und Immunoblot, den Lymphozyten-Transformationstest LTT und den Borreliendirektnachweis mit der PCR. Die Bestimmung erfolgt durchflußzytometrisch mit

fluoreszenzmarkierten, monoklonalen Antikörpern aus einem gewöhnlichen Blutbildröhrchen (EDTA-Blut). Die Röhrchen dürfen nicht abzentrifugiert oder eingefroren werden. Kühlung ist nicht erforderlich. Postversand über Nacht ist möglich, jedoch bitte möglichst zu Wochenanfang.

Abrechnung

Der LTT ist zwar prinzipiell im Leistungsspektrum des EBM enthalten, darf aber dennoch für Kassenspatienten nicht für die Erregerdiagnostik per Überweisung angefordert werden.

Der Lymphozytentransformationstest wird deshalb grundsätzlich privatärztlich nach der Gebührenordnung für Ärzte GOÄ'96 abgerechnet. Der Rechnungsbetrag bei 1,0-fachem GOÄ-Satz beträgt 161,44 Euro.

Für **Rückfragen** stehen Ihnen gerne zur Verfügung:

Dr. med. A. Gerritzen

Fon (0421) 2072-108

Mail: Andreas.Gerritzen@mlhb.de

Dr. rer. nat. D. Wolff

Fon (0421) 2072-203

Mail: Dietmar.Wolff@mlhb.de

Weitere Informationen zur Lyme-Borreliose wie auch zur Borreliosen-PCR direkt aus der Zecke finden Sie in unserem Internet-Schwerpunkt (www.mlhb.de/zecke) und in unseren Informationsschriften „Die Lyme-Borreliose“ und „Zeckenschnelltest auf Borreliosen und FSME“, die wir auf Anfrage gerne zur Verfügung stellen.

Literatur

Gerritzen, A. et al.: Lymphocyte Transformation Test (LTT) as a helpful diagnostic tool to detect active Lyme Borreliosis. *Int. J. Medical Microbiology* 2004; 294S1:196

Gerritzen, A. Verbesserte Borreliosen-Serologie durch Einsatz von rekombinanten Antigenen mit der Luminex-Technologie. *Borreliose Wissen* Nr. 17, Februar 2008, S. 14-16

Bauer, Y. et al.: 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; 31:767-776

Breier, F. et al.: Lymphocyte proliferation test in cutaneous manifestations of Lyme Borreliosis. *Wien Med Wochenschr.* 1995; 145 (7-8): 170-3.

Fendler, C. et al.: Longitudinal Investigation of Bacterium-Specific Synovial Lymphocyte Proliferation In Reactive Arthritis and Lyme Arthritis. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 784-788.

Dressler, F. et al.: The T-Cell Proliferative Assay in the Diagnosis of Lyme Disease. *Ann. Intern. Med.* 1991; 115; 533-539.

Burrascano, J.J.: Fortschritte im Verständnis der Lyme-Krankheit (Advanced Topics in Lyme Disease), 15. Ausgabe 2005, www.ilads.org/files/burrascano_0905.pdf

Stricker, R.B. Winger, E.E.: Decreased CD57 lymphocyte subset in patients with chronic Lyme disease. *Immunology Letters* 76; 43-48 (2001)

Stricker, R.B. et al.: Longterm decrease in the CD57 lymphocyte subset in a patient with chronic lyme disease. *Ann Agric Enviro Med* 9; 111-113 (2002)

Internet-Links

<http://www.mlhb.de/lyme-borreliose.html>