

Zelluläre Funktionstests in der immunologischen Labordiagnostik

Besser als ihr Ruf

Wolfgang Mayer, Friedrich-Wilhelm Tiller

Lymphozytenfunktionstests erlauben eine differenzierte Diagnostik bei zellulären Immunreaktionen, beispielsweise im Rahmen von Unverträglichkeitsreaktionen oder chronischen und latenten Infektionen. Sie erfordern jedoch eine besonders sorgfältige Indikationsstellung sowie Fachkenntnis bei der Durchführung und Bewertung.

Schlüsselwörter: LTT, ELISpot, ITT, IGRA, Allergiediagnostik, Infektionsdiagnostik, Zytokine

Mit der Aufklärung der grundlegenden Strukturen des zellulären Immunsystems vor etwa 50 Jahren begann auch die Suche nach Labormethoden, die dessen Leistungsfähigkeit und spezifische Funktionalität abbilden konnten. Der Lymphozytentransformationstest (LTT) wurde in den 1960er-Jahren als globaler Test zur Beurteilung der Kapazität des zellulären Immunsystems – vor allem zur Erkennung zellulärer Immundefekte und zur Klassifikation von Abstoßungsreaktionen bei der Organtransplantation – in die universitäre Immunologie eingeführt. Etwa 20 Jahre

später folgten Zytokinfreisetzungs-Assays wie zum Beispiel ELISpot, ITT, IGRA und CYRA, mit denen nicht die Transformation (Expansion, Proliferation) einer Zellpopulation, sondern die Fähigkeit immunkompetenter T-Zellen zur Freisetzung definierter Zytokine (Release) erfasst wurde.

Lymphozytentransformationstest

Das Prinzip des LTT beruht auf dem Nachweis einer lymphozytären Proliferationsantwort bei Kontakt mit unspezifischen, polyklonalen Mitogenen oder mit bestimmten Antigenen, gegen die bereits

eine zelluläre Sensibilisierung vorliegt (T-Gedächtniszellen). Dabei handelt es sich um ein außergewöhnlich komplexes, radioaktives Laborverfahren (Abb. 1) mit mehreren Arbeitsschritten (Isolation der PBMCs, fünf bis sieben Tage Primärkultivierung mit und ohne Stimulanzen, Read-out der Betastrahlung von eingebautem Tritium, Ergebnisdarstellung

als Verhältnis von stimulierter zu unstimulierter Einbaurate). Nichtradioaktive Alternativen wie etwa der Einbau von Bromdesoxyuridin (BRDU) oder die Durchflusszytometrie konnten sich wegen mangelnder Spezifität bzw. hohem Aufwand in der Routinediagnostik nie wirklich durchsetzen. Die Komplexität der Methode bietet Raum für eine Vielzahl von Modifikationen bei der Durchführung. So kann man zum Beispiel die Anzahl und Konzentration der Zellen im Ansatz, die Art und Qualität der Antigene, Mitogene oder Xenogene, die Zellkulturbedingungen, die Menge und Dauer des Tritiumpulses variieren. Eine allgemein anerkannte oder gar verbindliche Standardisierung der Methode fehlt bis heute, jedes Labor kocht gewissermaßen „sein eigenes Süppchen“. Bei professionell arbeitenden Laboren darf man unterstellen, dass mit einer hausinternen Validierung den Vorgaben der RiliBÄK entsprochen wird, aber eine Vergleichbarkeit der Resultate von Labor zu Labor ist beim LTT – wie auch bei anderen komplexeren In-vitro-Methoden – nicht zu erwarten.

Deshalb gab es verschiedene Ansätze zur Verbesserung der Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit des LTT-Verfahrens, beispielsweise der MELISA von 1994^[1]

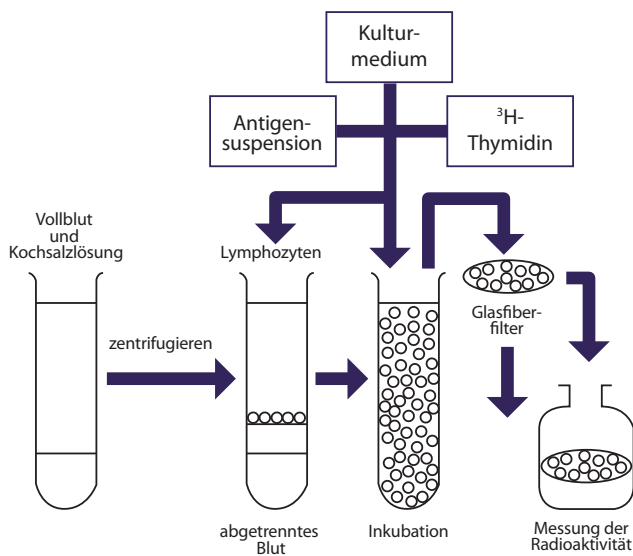


Abb. 1: Reaktionsprinzip des Lymphozytentransformationstests (Bild: Trillium, nach Bussa 1993).

oder der LTT-CITA von 2001^[2]. Vor diesem Hintergrund wurde und wird der LTT über seine eigentliche Anwendung als Immunfunktionstest mit Recall-Antigenen hinaus auch zur Ermittlung einer antigen- oder haptenspezifischen Sensibilisierung mit den Fragestellungen „Unverträglichkeitsreaktion“ und „aktive Infektion“ angeboten.

Vor allem im Bereich der Unverträglichkeitsreaktion z. B. gegenüber Zahnersatzmaterialien, Metallen und Chemikalien dient er heute als willkommene Ergänzung, wenn nicht gar als hochwertiger Ersatz für Hauttests (Prick-Test) zum Nachweis einer allergischen Typ-IV-Sensibilisierung (T-Zell-vermittelte Spättypreaktion). Der wesentliche Vorteil von In-vitro-Verfahren besteht darin, dass sie keine initiale Sensibilisierung durch den Test selbst auslösen.

Von Allergologen kam allerdings auch Kritik hinsichtlich der klinischen Validität der LTT-Reaktionen. Einige unter ihnen ordnen – auch durch Publikationen ge-

stützt – jegliche In-vitro-Reaktion in der Allergologie als klinisch irrelevant ein und stellen fest, dass eine T-Zell-Sensibilisierung mit Gedächtniszellen durchaus ohne entzündliche Charakteristik möglich sei^[3,4].

Auch der Einsatz in der Infektionsdiagnostik wirft Fragen auf: Von Borrelien über Chlamydien bis zu Herpesviren wird von manchen Einrichtungen pauschal jede positive LTT-Antwort zu einem klinischen Problem erklärt, was teure, aber fragwürdige Therapien rechtfertigen soll. Zu fordern ist hier stets eine differenzierte Betrachtung, die zwischen einer physiologischen Immunantwort auf latente Erreger wie zum Beispiel Herpesviren (oder auch Nahrungsmittel) und einer pathogenen Assoziation, beispielsweise einer Arzneimittel-Sensibilisierung, unterscheidet.

Zytokinfreisetzung

Im Gegensatz zum LTT erfasst man bei den Freisetzung-Assays die initiale Im-

munreaktion und nicht eine kumulierte, um Tage verzögerte In-vitro-Reaktion. Gemeinsamkeit aller Zytokinassays und Abgrenzung gegenüber dem LTT ist also die Messung von Botenstoffen nach einer relativ kurzen Inkubation von 24 bis 48 Stunden.

Hierfür existieren verschiedene Testvarianten. Grundsätzlich zu unterscheiden ist zwischen der Messung im Kulturüberstand (IGRA, ITT) und der Messung auf Einzelzellniveau (ELISpot = Enzyme Linked Immuno Spot). Letzterer arbeitet in der Mikrotiterplatte mit einem Zellrasen aus isolierten Lymphozyten (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs) und detektiert mit einem Enzymimmunoassay einzelne Zellen, die in der Inkubationsphase ein bestimmtes Zytokin freigesetzt haben. Es ist damit eines der wenigen In-vitro-Verfahren, die eine Angabe über die Frequenz der Immunantwort im peripheren Blut erlauben.

Das Verfahren wurde in den 1980er-Jahren beschrieben^[5] und verbreitete sich

	Lymphozytentransformationstest (LTT)		Cytokine-Release-Assays (CYRA)	
	(auch Leukozytentransformationstest, Lymphozytenstimulationstest, TTL, LST etc.)	ELISpot (Enzyme-Linked Immuno-Spot-Assay)	ITT (Immuntoleranztest oder Immun-Target-Test)	
			IGRA (IFN-Gamma-Release-Assay)	MZRA (Multi-Zytokin-Release-Assay)
Read Out	DNA-Neusynthese anhand Einbaurate von Tritium-markiertem Thymidin	Zytokinsekretion auf Einzelzellniveau, häufig IFN-gamma, auch andere Zytokine möglich	IFN-gamma-Sekretion im Überstand	Zytokinsekretion im Überstand (IL-2, IFN-gamma, IL-10, TNF-alpha, IL-1 und ggf. auch andere)
Inkubationszeit	5–7 Tage	24–48 h	24–48 h	24–48 h
Ausgangsmaterial	NH-Blut	NH-Blut	NH-Blut	NH-Blut
In-vitro-Ansatz mit	isolierten PBMCs	isolierten PBMCs	Vollblut	Vollblut
Ergebnis	SI (Stimulationsindex), Verhältnis von Tritium-Einbaurate in der stimulierten Kultur zur Basalkultur	Frequenz an Zytokinsekretierenden Zellen	pg/ml IFN-gamma	pg/ml Zytokine
Aussage	Zellproliferation nach 5–7 Tagen	Frequenz an initial reagierenden Zellen	Initiale IFN-gamma-Sekretion, quantitativ	Initiale Zytokinsekretion, quantitativ
Nachweis v. Gedächtniszellantworten	ja	ja, wenn IL-2 mit erfasst wird	nein, primär TH1-Effektorantwort	ja, über IL-2
Nachweis v. Effektorzellantworten	nein	ja (TH1, auch andere möglich)	ja, TH1	ja (TH1, Treg, TH2, ggf. auch TH17, Monozyten)
Stimulanzien/Antigene	Recall-Antigene, Xenobiotika (Medikamente, Umweltschadstoffe), Metalle, Infektionserreger, Nahrungsmittel	Recall-Antigene, Xenobiotika (Medikamente, Umweltschadstoffe), Metalle, Infektionserreger	Mycobacterium tuberculosis, spezifische Antigene	Recall-Antigene, Xenobiotika (Medikamente, Umweltschadstoffe), Metalle, Infektionserreger
Anwendungen	Überprüfung der zellulären Immunfunktion nur auf T-Gedächtniszellebene, Nachweis von Medikamentensensibilisierungen, Typ-IV-Sensibilisierungen, Nachweis von T-Gedächtniszellen gegenüber Infektionserregern und Nahrungsmitteln	Vielfältige Anwendungen je nach Antigen und Zytokin-Read-out von zellulärer Immunfunktion bis zu Infektionsnachweis TBC über die IFN-gamma-Induktion aus T- und NK-Zellen (T-Spot)	Spezielle Anwendung als Infektionsnachweis von TBC über die IFN-gamma-Induktion aus T- und NK-Zellen	Überprüfung der zellulären Immunfunktion von T-Gedächtnis- und Effektorzellen sowie Monozyten, Nachweis und entzündliches Potenzial von Medikamentensensibilisierungen bzw. anderen immunologischen Sensibilisierungen, Gedächtnis- und Effektorantwort (Immunkompetenz) gegenüber Infektionserregern

Tab. 1: Nachweisprinzipien und Interpretation verschiedener Lymphozytenfunktionstests.

ähnlich dem LTT zunächst im universitären Umfeld, vor allem in der Infektions-, Allergie- und Autoimmundiagnostik sowie der Transplantationsmedizin. Ursprünglich wurde meist nur ein Zytokin detektiert; jüngste Weiterentwicklungen (Multicolor-ELISpots) sind auch in der Lage, mehrere Zytokine zu unterscheiden.

Methoden zur Messung im Kulturüberstand basieren auf Vollblutstimulationen und erfassen die Gesamtmenge an freigesetzten Botenstoffen. Als bestes Beispiel sei der Interferon Gamma Release Assay (IGRA) zum Nachweis einer latenten TBC-Infektion angeführt, der Anfang 2011 in den EBM-Katalog aufgenommen wurde (EBM 32670). Während der IGRA speziell IFN- γ berücksichtigt, werden im sog. Immuntoleranztest (ITT) beispielsweise IFN- γ , IL-2, IL-10 und TNF- α gleichzeitig erfasst. Dieser Test erlaubt damit die derzeit differenzierteste Beurteilung einer In-vitro-Immunantwort.

Gerade bei infektiologischen Fragestellungen ermöglicht diese umfassende In-vitro-Zytokinantwort Einblicke in die Aktivität chronischer oder latenter Infektionen^[6]. Indem man beispielsweise das Verhältnis von Schlüsselzytokinen wie IL-2 zu IFN- γ bestimmt, kann man sowohl – analog zur LTT-Reaktion – die Proliferationsantwort auf einen IL-2-Reiz, als auch die TH1-Effektorqualität der Reaktion beurteilen. Hohe Quotienten sprechen für eine Chronifizierung der Infektion.

Für die klinische Bewertung ist eine Messung mehrerer Effektorzytokine empfehlenswert. Dadurch kann gerade bei vermuteten Allergenen sowohl das klinisch relevante entzündliche Potenzial der Reaktion (über proinflammatorische Mediatoren wie IFN- γ oder TNF- α), als auch eine klinisch stumme Toleranzcharakteristik der Reaktion (über regulatorische Zytokine wie IL-10) erkannt werden.

Nicht überraschend erscheint, dass mit Erfolg versucht wird, die differenzierte


Zytokinantwort vor allem dort einzusetzen, wo übliche, klassenspezifische immunserologische Verfahren ihre Grenzen haben, etwa bei der Borreliose, bei Infektionen mit Chlamydien oder mit Viren der Herpesgruppe. Derartige Anwendungen erfordern eine sehr gezielte Indikationsstellung als letzten Punkt einer sorgfältigen Stufendiagnostik sowie seitens des Labors hohe methodische Expertise und engen Kontakt zum klinisch tätigen Arzt.

Kritische Bewertung

Der LTT ist und bleibt ein geeignetes Verfahren, um die Reaktionsfähigkeit einer bestimmten Lymphozytenpopulation global zu beurteilen. Aussagen zur funktionalen Bedeutung und damit zur klinischen Relevanz sind dagegen nur bedingt möglich, und auch nur dann, wenn er – wie alle komplexen In-vitro-Verfahren – von A bis Z extrem sorgfältig durchgeführt wird; das betrifft insbesondere die Qualität und Spezifität der eingesetzten Antigene. Unter dieser Voraussetzung weist das RKI^[7] dem LTT eine eng begrenzte Berechtigung bei der Feststellung von Arzneimittel-Sensibilisierungen, zur Überprüfung der zellulären Immunfunktion mittels Recall-Antigenen sowie für den Nachweis einer Beryllium-Sensibilisierung zu. So ist er auch Bestandteil der kassenärztlichen Versorgung (EBM-Ziffer 32532).

Auch Zytokinfreisetzungs-Assays unterliegen einer strengen Indikationsstellung, kommen aber wegen ihrer differenzierteren Aussage häufiger als der LTT zum Einsatz. Insbesondere der ELISpot-Test ist zu einem wertvollen diagnostischen Werkzeug geworden, das die klassische Immunologie bei schwierigen Fragestellungen sinnvoll ergänzt.

Die unkritische Anwendung des LTT und in geringerem Maße auch des ELISpot-Verfahrens führte in der Vergangenheit jedoch zu klinischen Fehlinterpretationen und brachte diese Tests in Misskredit.

Insbesondere sind sehr weit gefasste Interpretationen fragwürdig, also zum Beispiel die Gleichsetzung einer nachgewiesenen Sensibilisierung mit der klinischen Assoziation einer Nahrungsmittelallergie oder die Begründung einer Therapieüberwachung bei Borreliose. Eine pauschale Verurteilung aller zellulären Testverfahren als Folge missbräuchlicher Anwendung ist keineswegs gerechtfertigt. Ganz im Gegenteil erscheint das diagnostische Potenzial insbesondere der Zytokinassays bei Weitem noch nicht ausgeschöpft. 

Literatur

- [1] Stejskal V et al. MELISA – an in vitro tool for the study of metal allergy. *Toxicol In Vitro* 1994; 8:991–1000
- [2] v.Baehr V et al. Improving the in vitro antigen specific T cell proliferation assay. *J Immunol Methods* 2001; 251:63–71
- [3] Cavani A et al. Patients with allergic contact dermatitis to nickel and nonallergic individuals display different nickel-specific T cell responses. *J Invest Dermatol* 1998; 111:621–628
- [4] Adel A et al. Th1 and Th2 cytokine profile of CD4 and CD8 positive peripheral blood lymphocytes in nickel contact dermatitis. *Centr Eur J Immunol* 2013; 38:100–106
- [5] Czerkinsky C et al. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983; 65, Nr. 1–2:109–21
- [6] Pantaleo G, Harari A. Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nature Reviews Immunol* 2006; 6:417–23
- [7] Robert Koch Institut. Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz 2004; 47:73–9, Addendum Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz 2008; 51:1070–6



Dipl.-Biol. Wolfgang Mayer

*IMMUMED Ges. für angewandte Immunologie
wm@immumed.de*

*Priv.-Doz. Dr. med. Friedrich-W. Tiller
Bavaria Health Center*