

Aus dem Institut für Virologie  
Abteilung für Transplantations- und Infektionsimmunologie  
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester

**Immundiagnostik der Tuberkulose mittels rascher  
durchflusszytometrischer Detektion antigenspezifischer T-Zellen bei  
latenter Infektion und aktiver Erkrankung**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

2012

vorgelegt von

Mathias Fousse

geboren am 22.05.1982 in Neunkirchen/Saar

Tag der Promotion:

Dekan:

Berichterstatter:

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	8
<b>1 Zusammenfassung</b>	10
<b>1 Summary</b>	12
<b>2 Einleitung</b>	14
2.1 Geschichte und aktuelle Epidemiologie der Tuberkulose	14
2.2 Charakterisierung der Erreger der Tuberkulose und der immunpathologischen Vorgänge	15
2.3 Das Krankheitskontinuum der Tuberkulose-Infektionen	18
2.3.1 Die aktive Tuberkulose-Infektion	18
2.3.2 Differenzierung der stattgehabten und latenten Tuberkulose und das Risiko der Reaktivierung	19
2.3.3 Exkurs: Erhöhtes Tuberkuloserisiko bei der Therapie rheumatischer Erkrankungen	20
2.3.4 BCG-Immunisierung und Therapie	21
2.4 Diagnostisches Spektrum	22
2.4.1 Radiodiagnostik und direkter Keimnachweis in der klinischen Routine	22
2.4.2 Die immunologische Diagnostik: Von der zellulären Immunantwort in vivo zur spezifischen Reaktivität in vitro	23
2.5 Nachweis zellulärer Immunität in vitro durch spezifischen Reaktivitätsnachweis	25
2.5.1 Methodik des Reaktivitätsnachweises	25
2.5.2 Antigene zum Reaktivitätsnachweis	26
2.5.3 Mehr als nur zelluläre Immunität: Rückschlüsse von dem Reaktivitätsprofil auf das Erkrankungsstadium	28
2.6 Ziele der Arbeit	28
<b>3 Methoden</b>	30
3.1 Patienten und Probanden	30

3.2	Software und Statistische Analyse	31
3.3	Materialien und Reagenzien	32
3.4	Grundprinzipien	35
3.4.1	Stimulation	35
3.4.2	Durchflusszytometrie	35
3.5	Isolierung der PBMC über Ficollgradienten	36
3.5.1	Prinzip	36
3.5.2	Durchführung	36
3.5.3	Zellzählung	37
3.6	Nachweis einer zellulären Immunität durch antigenspezifische Stimulation	37
3.6.1	Prinzip	37
3.6.2	Stimulationsansatz aus Vollblut	38
3.6.3	Antikörper-Färbung	39
3.6.4	Bestimmung des Anteils der reaktiven CD4-T-Zellen	40
3.7	ELISPOT-Assay	41
3.7.1	Prinzip	41
3.7.2	Durchführung der ELISPOT-Assays	41
3.8	<sup>3</sup> H-Thymidin-Proliferationsassay	43
3.8.1	Prinzip	43
3.8.2	Durchführung	43
3.9	Tuberkulin-Hauttest nach Mendel-Mantoux	44
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
4.1	Der Einsatz des im traditionellen Hauttest verwendeten Tuberkulins zeigt in vitro hohe Effektivität bei der Diagnostik von Tuberkulose-Infektionen	45
4.1.1	Hochsignifikante Korrelation der mittels Tuberkulin-Stimulation in vivo und in vitro detektierten zellulären Immunantwort	45
4.1.2	Grenzwertberechnung für die Durchflusszytometrie	48

4.2	Komplettierung der durch Tuberkulin vermittelten immunologischen Diagnostik der latenten Tuberkulose mittels Einsatz der <i>M. tuberculosis</i> spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10	50
4.2.1	Unterscheidung einer durch BCG-Impfung oder durch Kontakt mit <i>Mycobacterium tuberculosis</i> induzierten Immunantwort mittels Verwendung von ESAT-6 und CFP-10 im Vollblut-Assay	50
4.2.2	Signifikante Korrelation zwischen der Frequenz PPD-reaktiver und <i>M. tuberculosis</i> -spezifischer CD4-T-Zellen bei immunkompetenten Individuen	52
4.2.3	Deutliche Unterschiede in der Verteilung der Reaktionsmuster der Individuen mit reaktiven T-Zellen abhängig vom Immunstatus und Expositionsrisiko	53
4.2.4	Die Höhe der Frequenz der reaktiven CD4-T-Zellen gegen PPD ist bedingt vom Vorhandensein reaktiver CD4-T-Zellen gegen die <i>M. tuberculosis</i> spezifischen Antigene	57
4.2.5	Signifikante Korrelation zwischen der Durchflusszytometrie und den ELISPOT-Assays zum Nachweis einer zellulären Immunität gegen <i>Mycobacterium tuberculosis</i> und <i>Cytomegalievirus (CMV)</i>	58
4.2.6	Befähigung der auf PPD und ESAT-6 reaktiven Zellen zur Zellteilung im Thymidin-Proliferationsassay	62
4.3	Diagnostik der latenten Tuberkulose-Infektion bei immunkompromittierten Patienten mit rheumatischen Erkrankungen	64
4.3.1	Patientencharakterisierung und Diagnostik der latenten Tuberkulose durch Standard-Verfahren sowie durch Nachweis reaktiver Zellen	64
4.3.2	Bewertung der Ergebnisse mit Entscheidungsfindung anhand eines Algorithmus zur Diagnosestellung und Behandlung einer latenten Tuberkuloseinfektion	69
4.4	Unterscheidungsmerkmale zwischen einer abgelaufenen und einer immunologisch frischen Tuberkulose-Infektion	72
4.4.1	Frequenzen PPD reaktiver CD4-T-Zellen liegen signifikant höher bei der aktiven Tuberkulose-Infektion	73
4.4.2	Hinweise auf aktive Tuberkulose durch verändertes Zytokinprofil	74

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	77
5.1	Die vergleichende Analyse des durchflusszytometrischen Verfahrens und des Hauttests nach Mendel-Mantoux durch den Einsatz des Tuberkulins in vitro und in vivo	77
5.2	Die durchflusszytometrische Charakterisierung der T-Zellantwort gegen die <i>M. tuberculosis</i> spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10	79
5.2.1	Erhöhte Spezifität durch Kombination des Tuberkulins mit den <i>M. tuberculosis</i> spezifischen Antigenen in der in-vitro-Stimulation	79
5.2.2	Nachweis der latenten Tuberkulose (LTBI) mittels Durchflusszytometrie bei Immungesunden und Patienten mit Immundefizienz	80
5.3	Die Wertigkeit der Durchflusszytometrie im Vergleich mit anderen Interferon-Gamma-Release-Assays (IGRA) und mit einem <sup>3</sup> H-Thymidin-basiertem Proliferationsassay	82
5.4	Durchflusszytometrische Diagnostik der latenten Tuberkulose bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen vor Therapie mit TNF-Antagonisten	87
5.5	Abgrenzung einer aktiven Tuberkulose von einer stattgehabten Infektion	91
5.6	Zusammenfassung und Ausblick	95
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	98
<b>7</b>	<b>Publikationen</b>	109
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	109
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	112

## Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
APC	Allophycocyanin
APC	Antigenpräsentierende Zelle
A-TB	active tuberculosis; aktive Tuberkulose
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation
CFP-10	culture filtrate antigen 10
Ci	Curie
CMV	Cytomegalievirus
DMARD	disease modifying antirheumatic drug
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunospot (assay)
ESAT-6	early secretory antigenic target 6
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	forward scatter
Gln	Glutamin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IFN $\gamma$	interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IGRA	interferon gamma release assay
IL	Interleukin
INH	Isoniazid
IQR	Interquartile range



L	Lösungsmittel
LTBI	latent tuberculosis infection; latente Tuberkuloseinfektion
M.	Mycobacterium
MDR-TB	multiresistant-drug tuberculosis
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex
NAT	Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PPD	purified protein derivate; Tuberkulin
QFT-G	QuantiFERON Tb-Gold
QFT-GIT	QuantiFERON Tb-Gold In-Tube
RA	Rheumatoide Arthritis
RD1	region of difference 1
RKI	Robert-Koch-Institut
ROC	receiver operating characteristic
rpm	revolutions per minute
SEB	staphylococcal enterotoxin B
SI	Stimulationsindex
SSC	side scatter
STIKO	Ständige Impfkommission
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
T-TB	treated tuberculosis; behandelte Tuberkulose
WHO	World Health Organization
XDR-TB	extensively drug-resistant tuberculosis
$\alpha$	alpha/anti
$\beta$	beta
$\gamma$	gamma
$\kappa$	kappa

# 1 Zusammenfassung

Die Tuberkulose stellt weltweit eine der führenden Ursachen erhöhter Morbidität und Mortalität dar und steht mit rasch steigender Inzidenz an 7. Stelle aller Todesursachen. Zur Diagnostik einer aktiven Tuberkulose stehen Testverfahren zum Direktnachweis zur Verfügung. Demgegenüber wird eine latente Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* durch Detektion einer spezifischen Immunantwort diagnostiziert. Der hier gebräuchliche Tuberkulin (PPD) Hauttest findet in vivo breite klinische Anwendung, weist jedoch falsch positive Ergebnisse bei vorausgegangener BCG-Immunisierung (Bacille Calmette-Guérin) auf und zeigt insbesondere bei Immundefizienz eine niedrige Sensitivität. In jüngster Zeit wurden neue Verfahren entwickelt, die den Nachweis einer spezifischen Immunität in vitro anhand der Induktion von IFN $\gamma$  (Interferon gamma) ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues durchflusszytometrisches Verfahren zum Nachweis einer latenten Infektion mit *M. tuberculosis* evaluiert. Dies erfolgte im direkten Vergleich einerseits mit dem Hauttest und andererseits mit zwei kommerziellen ELISPOT-Assays. Desweiteren wurde ein Kollektiv immundefizienter Patienten mit rheumatischen Erkrankungen untersucht. In einem letzten Schritt wurde abschließend die Wertigkeit eines veränderten Zytokinprofils zur Unterscheidung einer aktiven und einer erfolgreich behandelten Tuberkulose ermittelt.

Beim Vergleich der zellulären Immunität in vivo und in vitro zeigte sich eine signifikante Korrelation der quantitativen Ergebnisse ( $r=0,5749$  für Immungesunde und  $r=0,5318$  für Immunkompromittierte, jeweils  $p<0,0001$ ). Mittels ROC-Analyse konnte ein für die Induration von 15 mm im Hauttest bester Grenzwert von 0,115% reaktiver CD4-T-Zellen ermittelt werden. Die Analyse der qualitativen Ergebnisse erbrachte insbesondere bei Immundefizienz eine bezogen auf die Durchflusszytometrie niedrige Sensitivität des Hauttests. Durch separate Stimulation mit den für *M. tuberculosis* spezifischen Antigenen ESAT-6 und CFP-10 konnte durchflusszytometrisch eine spezifische Immunantwort detektiert und von einer BCG-Impfantwort durch deren alleinige Reaktivität auf PPD abgegrenzt werden. Eine signifikante Korrelation ergab sich auch bei Vergleich zweier ELISPOT-Assays mit der Durchflusszytometrie ( $r=0,8812$ ,  $p<0,0001$ ). Parallel konnte mittels Thymidin-Proliferationsassay eine Befähigung reaktiver Zellen zur Zellteilung nachgewiesen werden, obgleich sich insbesondere bei der Verwendung von ESAT-6 ein höherer Anteil diskordanter Ergebnisse mit der Durchflusszytometrie zeigte. Praktischen Einsatz fand die Durchflusszytometrie beim Screening eines Kollektivs immunkompromittierter Patienten mit

rheumatischen Erkrankungen auf latente Tuberkulose vor geplanter medikamentöser TNF $\alpha$ -Inhibition. Reaktivität auf ESAT-6 oder CFP-10 vermochte mehr und andere Individuen als latent infiziert zu identifizieren als das Screening mit Röntgen-Thorax und Tuberkulin-Hauttest. Interessanterweise konnte mittels durchflusszytometrischer Analyse der PPD spezifischen IFN $\gamma$ /IL-2 Zytokinprofils eine Unterscheidung zwischen einer aktiven und einer abgelaufenen Tuberkulose getroffen werden. Hierbei deutete ein Anteil von <56% doppeltpositiver PPD-reaktiver Zellen mit einer Spezifität von 100% und einer Sensitivität von 70% auf eine aktive Erkrankung hin.

Zusammenfassend bereichert die durchflusszytometrische Quantifizierung der *M. tuberculosis* spezifischen Immunantwort die Immundiagnostik der latenten und aktiven Tuberkulose. Dies gilt insbesondere bei Patienten mit Immundefizienz, bei denen der Einsatz von Tuberkulin in vitro mit einer im Vergleich zum Hauttest erhöhten Sensitivität verbunden ist. Eine erhöhte Spezifität der in vitro Verfahren ergibt sich darüber hinaus durch den Einsatz der *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10. Interessanterweise kann durch alleinige Analyse der IFN $\gamma$  Produktion keine Aussage über das Erkrankungsstadium gemacht werden. In dieser Hinsicht bietet die Durchflusszytometrie die Möglichkeit zur Multiparameteranalyse, so dass über Zytokinprofile erstmals eine rasche Unterscheidung zwischen aktiver und abgelaufener Infektion getroffen werden kann.

## 1 Summary

Tuberculosis is one of the leading causes of increased morbidity and mortality around the world and stands with a rapidly rising incidence at 7. place of all causes of death. An active tuberculosis diagnosis is confirmed by direct detection tests. On the other hand, a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* is diagnosed by detecting a specific immune response. Here common tuberculin (PPD) skin test despite false positive results in BCG-vaccinated individuals (Bacille Calmette-Guérin) and low sensitivity particularly in immunodeficient patients finds in vivo a wide clinical practice. Recently developed new methods allow evidence of a specific immunity in vitro by induction of IFN $\gamma$  (Interferon gamma). A new flow-cytometric assay for the detection of a latent infection with *M. tuberculosis* has been evaluated in this work. This was done as well in direct relation with the skin test as comparing with two commercial ELISPOT (enzyme-linked immunospot) assays. Also we examined a collective of immunodeficient patients with inflammatory arthropathies. Finally the significance of a modified cytokine profile to distinguish active tuberculosis from successfully treated disease was evaluated.

When comparing the cellular immune responses in vivo and in vitro a significant correlation of the quantitative results was shown ( $r=0.5749$  for immunocompetent patients and  $r=0.5318$  for immunocompromised patients, each  $p<0.0001$ ). Using ROC analysis a best limiting value at 15 mm for the skin test induration was shown at 0.115% reactive T cells. Analysis of the qualitative results delivered especially in immunodeficiency a low sensitivity of the skin test relative to the flow-cytometric assay. Separate stimulation with *M. tuberculosis* specific antigens ESAT-6 (early secretory antigenic target 6) and CFP-10 (culture filtrate antigen 10) using flow-cytometry could detect a specific immune response and distinguished from a BCG vaccination by its sole reactivity to PPD. A significant correlation was revealed when comparing two ELISPOT assays with flow-cytometric assay (each  $r=0.8812$ ,  $p<0.0001$ ). In addition competence of reactive cells to the cell division could be demonstrated by thymidine proliferation assay although especially by using ESAT-6 a higher proportion of discordant results in comparison with the flow-cytometric assay was demonstrated. Flow-cytometric screening on latent tuberculosis infection in immunocompromised patients with inflammatory arthropathies found practical use before scheduled treatment with TNF $\alpha$  (Tumor-necrosis-factor-alpha) blocking drugs. Reactivity to ESAT-6 or CFP-10 made it possible to identify more and other individuals as latent infected as the screening by chest x-ray and tuberculin

skin test. Interestingly a distinction between an active and a successfully treated tuberculosis could be made by flow-cytometric analysis of the PPD specific cytokine profiles detecting IFN $\gamma$  and IL-2 (Interleukin 2). In the process less than 56% of these double positive PPD specific T cells indicated an active disease with specificity of 100% and sensitivity of 70%.

To summarise, flow-cytometric quantification of *M. tuberculosis* specific immune response enriched immune diagnosis of active and latent tuberculosis. This applies particularly to patients with immunodeficiency because here the use of tuberculin in vitro caused an increased sensitivity compared to the skin test. Increased specificity of in vitro procedure arises also from the use of *M. tuberculosis* specific antigens ESAT-6 and CFP-10. Interestingly single analysis of the IFN $\gamma$  production cannot be used to estimate the stage of the disease. In this respect, the flow-cytometry provides the ability to a multiparameter analysis so that for the first time a rapid distinction between active and expired infection can be made by cytokine profiles.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Geschichte und aktuelle Epidemiologie der Tuberkulose**

Frühe Fälle von Tuberkulose traten wohl bereits vor Jahrtausenden in Ägypten und dem antiken Griechenland auf (DANIEL, 2006). In Europa und Nordamerika kam es im 18. und 19. Jahrhundert zu Epidemien mit hohen Todesraten, so starb Anfang des 19. Jahrhunderts jeder Dritte in London an der Schwindsucht (GOERKE, 2000). Nachdem Jahrzehnte über die Ursachen der „weißen Pest“ nur spekuliert werden konnte, gelang es Robert Koch 1882 einen Zusammenhang zwischen Tuberkelbazillen und der Schwindsucht nachzuweisen. Mit Entdeckung wirksamer Medikamente begonnen mit Streptomycin und einer Impfung im 20. Jahrhundert schien die menschliche Tuberkulose rasch an Bedeutung zu verlieren (GOERKE, 2000; DANIEL, 2006). Bei Betrachtung der aktuellen weltweiten Tuberkulose-Situation kann jedoch ein beängstigender Wiederanstieg der Tuberkulose-Infektionen beobachtet werden. Während die World Health Organization (WHO) 1990 weltweit 6,6 Millionen Neuerkrankungen registrierte, waren es 2000 bereits 8,3 Millionen (WHO, 2009) und 2008 9,4 Millionen (WHO, 2010b). 2009 stagnierte die Zahl der Neuerkrankungen mit etwa 9,4 Millionen weltweit, was einer Inzidenz von 137 Fällen pro 100.000 Einwohner entsprach (WHO, 2010a). Davon entfielen allein 55% auf Asien und 30% auf Afrika, während nur 4% in der WHO-Region Europa und 3% in der WHO-Region Amerika auftraten. Laut WHO verzeichneten Indien, China, Südafrika, Nigeria und Indonesien den stärksten Inzidenzanstieg. Schätzungsweise 1,7 Millionen Menschen (darunter 0,4 Millionen HIV negativ) unter allen Tuberkulose-Kranken starben 2009 an der Erkrankung (WHO, 2010a). Zwei erhebliche Probleme verkomplizieren die Tuberkulose-Situation: Das Risiko für Tuberkulose-Erkrankungen ist unter Immundefizienz insbesondere HIV-Infektionen erheblich erhöht (MTEI et al., 2005). So wiesen von den 9,4 Millionen Fällen etwa 1,1 Millionen (12%) eine HIV-Ko-Infektion auf, unter diesen alleine 80% in Afrika. Damit hat sich die Inzidenz an Doppelinfektionen im Vergleich zu 2007 mehr als verdoppelt. Häufig sind die Patienten in den Regionen betroffen, in welchen sie sich weder die Behandlung der Tuberkulose noch der HIV-Infektion leisten können und die Diagnostik nicht gewährleistet ist. In der Summe führt dies zu einer weiteren Verbreitung der Tuberkulose und erhöhter Mortalität unter den Patienten. Das zweite Problem stellt die zunehmende Anzahl an Resistenzsituationen dar: Für 2008 schätzt die WHO die Anzahl von multiresistenten Tuberkulose-Infektionen (MDR-TB;

multidrug-resistant tuberculosis), also mit einer Resistenz gegen mindestens beide wirksamsten Erstrangmedikamente Isoniazid und Rifampicin, auf geschätzte 440.000 Fälle mit höchstem Vorkommen in China, Indien, Russland, Südafrika und Russland (WHO, 2010a). Auch die Fälle mit hochresistenten Tuberkulose-Stämmen (XDR-TB, extensively drug-resistant tuberculosis) mit zusätzlicher Resistenz gegen Zweitrangmedikamente nehmen an Häufigkeit zu und sind mit erhöhter Mortalität, verlängerter Behandlungsdauer und steigenden Kosten verbunden (EKER et al., 2008). Die Situation in Deutschland unterscheidet sich noch erheblich von der weltweiten Krise: 2008 wurden hier 4513 Fälle der meldepflichtigen Erkrankung registriert, was einer Inzidenz von 5,5 pro 100.000 Einwohner entspricht und im Vergleich zum Vorjahr mit 6,1 leicht gesunken ist (BRODHUN et al., 2010). Von diesen Erkrankten besaßen etwa 2/3 die deutsche Staatsbürgerschaft und erkrankten im Gegensatz zur ausländischen Bevölkerung eher im höheren Alter (höchste Inzidenz bei Männern >69 Jahre mit 12,6). Bei Kindern und Jugendlichen unter 15 Jahren war die Inzidenz mit 1,1 pro 100.000 Kinder ebenfalls rückläufig. Etwa 11,7% zeigten eine Resistenz gegen mindestens eines der fünf Erstrangmedikamente (jegliche Resistenz) und 1,5% eine MDR-TB. Resistenzsituationen traten vorwiegend bei im Ausland geborenen oder vorbehandelten Patienten auf. Die Letalität war von 3,0% im Vorjahr auf 3,5% leicht gestiegen (BRODHUN et al., 2010). Obwohl die Situation in Deutschland scheinbar noch recht entspannt ist, muss die weltweite Entwicklung im Zeichen der Globalisierung Besorgnis erregen. Eine Person mit nicht behandelter aktiver Tuberkulose wird durchschnittlich etwa 10 bis 15 weitere Personen pro Jahr infizieren (WHO, 2010b). Bei steigenden Inzidenzraten in Osteuropa (WHO, 2009) mit zunehmender Resistenzlage vor allem in Russland, ist absehbar, dass mittelfristig auch in Deutschland die fast besiegt geglaubte Seuche erneut in den Mittelpunkt medizinischer Diagnostik und Therapie rücken wird.

## **2.2 Charakterisierung der Erreger der Tuberkulose und der immunpathologischen Vorgänge**

Die Erreger der Tuberkulose gehören zu der Familie der *Mycobacteriaceae* und wurden erstmals 1882 durch Robert Koch nachgewiesen. Mykobakterien sind unbewegliche, nichtsporenbildende, aerob wachsende Stäbchenbakterien. Eine Einteilung der Erreger erfolgt aufgrund deren Krankheitsbilder in *M. tuberculosis*-Komplex, *M. leprae* und die atypischen Mykobakterien MOTT (*Mycobacteria Other Than Tuberculosis*). Als Erreger der menschlichen Tuberkulose gelten die dem *M. tuberculosis*-Komplex zugeordneten *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canettii* und *M. africanum* (BRODHUN et al., 2010),

wobei der überwiegende Anteil der in Deutschland verursachten Tuberkulose-Infektionen durch das *M. tuberculosis* mit dem Mensch als Reservoir verursacht werden. 2008 waren 97,7% der Tuberkulose-Fälle in Deutschland durch *M. tuberculosis* und 1,7% durch *M. bovis* bedingt (BRODHUN et al., 2010). *M. bovis* weist ein sehr weites Wirtsspektrum auf, Menschen infizieren sich jedoch meist über infizierte Rinder oder durch Ingestion kontaminierter Milch (primäre Darmtuberkulose). Nach dem zweiten Weltkrieg waren 10 bis 30% der menschlichen Tuberkulosefälle in Deutschland durch *M. bovis* bedingt, mit systematischer Auslöschung der Rindertuberkulose ist dieser Anteil auf etwa 1 bis 2% gesunken (MEISSNER, 1974; KUBICA et al., 2003; SCHUBEL et al., 2006), heute meist in Formen von extrapulmonalen Tuberkulosen bei älteren Personen (HLAVSA et al., 2008; MIGUELEZ et al., 2009). Extrem selten sind menschliche Tuberkulose-Infektionen durch *M. canettii* (SOMOSKOVI et al., 2009) und *M. microti*. Letztgenanntes Mykobakterium ist an Wühl- und Feldmäuse adaptiert und kann in seltenen Einzelfällen auch bei immundefizienten Menschen ursächlich für eine Tuberkulose sein (VAN SOOLINGEN et al., 1998; DE JONG et al., 2009b). Während *M. africanum* in Deutschland keine Rolle spielt, scheint es in Sub-Sahara-Afrika häufiger als Erreger der menschlichen Tuberkulose vorzukommen und mit HIV-Ko-Infektionen vergesellschaftet zu sein (VIANA-NIERO et al., 2001; DE JONG et al., 2009a).

Bei der Tuberkuloseerkrankung kommt es zur Ausbildung einer granulomatösen Entzündung in infizierten Organen. Die Pathogenität der Mykobakterien ist durch einen hohen Wachs- und Lipidanteil in ihrer Zellwand begründet. Dadurch zeigen sich die Erreger relativ unempfindlich gegenüber chemischen und physikalischen Noxen und weisen eine niedrige Permeabilität für Antibiotika auf. Aufgrund einiger Virulenzfaktoren, insbesondere des „Cord-Faktors“ (Trehalose-Dimykolat), kann *M. tuberculosis* nach Phagozytose in Makrophagen überleben (BÖCKER et al., 2004). Durch Hemmung der Phagosomen-Lysosomen-Fusion wird der Erreger nicht eliminiert, sondern kann sich intrazellulär im Phagosom vermehren und den Zelltod der Makrophagen initiieren. Nach Freisetzung kann sich das Mykobakterium lymphogen, hämatogen oder bronchogen ausbreiten, bis es erneut von Makrophagen phagozytiert wird (BÖCKER et al., 2004). Makrophagen erlangen die Befähigung zur Bakterizidie erst unter dem Einfluss von spezifischen CD4-T-Zellen, deren Ausbildung bei einem immunkompetenten Individuum einige Wochen benötigt (JANEWAY, TRAVERS, 2002; BÖCKER et al., 2004). Die Aktivierung der CD4-T-Zellen erfolgt nach Erkennung mykobakterieller Antigene, welche durch MHC-II-Moleküle (major histocompatibility



complex) auf der Zelloberfläche der Makrophagen präsentiert werden. Durch Expression des CD40-Liganden und Sekretion von Interferon Gamma (IFN $\gamma$ ) dieser aktivierten Th1-Zellen (T-Helfer-Zellen) werden die Makrophagen wiederum aktiviert und sind in der Lage aufgenommene Bakterien auf zellulärer Ebene durch Bildung von hochreagiblen Stickstoffverbindungen zu zerstören (JANEWAY, TRAVERS, 2002; BÖCKER et al., 2004). Sofern nicht alle intrazellulären Erreger oder deren Bestandteile durch die Makrophagenaktivierung eliminiert werden, kann der Organismus über zelluläre Mechanismen versuchen, die Erreger durch Ausbildung tuberkulöser Granulome zu arretieren und abzuschotten (NETTER, BÖTTCHER, 2001; JANEWAY, TRAVERS, 2002; BÖCKER et al., 2004): Unter dem Einfluss von T-Helferzellen kommt es zur Aktivierung von Makrophagen und Einwanderung weiterer Monozyten und schließlich zur Umwandlung zu Epitheloidzellen, welche palisadenartig das Granulomzentrum umschließen. Teilweise verschmelzen diese Epitheloidzellen zu mehrkernigen Riesenzellen und sind ebenfalls an der Granulombildung beteiligt. Umgeben wird dieses Grundgranulom bei erhaltener Immunabwehr meist von Lymphozyten und Plasmazellen zur Stabilisierung des Gefüges und Abgrenzung von Erregern (NETTER, BÖTTCHER, 2001; JANEWAY, TRAVERS, 2002; BÖCKER et al., 2004). Durch Sekretion eines makrophagenaktivierenden Faktors durch die Epitheloidzellen werden junge Monozyten im Bereich des Granuloms in ihrer Mobilität eingeschränkt und können so zur Stärkung des zellulären Schutzwalls beitragen (BÖCKER et al., 2004). Durch Sauerstoffmangel und zytotoxische Wirkung von aktivierten Makrophagen kann es im Zentrum des Granuloms zum Absterben von Zellen und Ausbilden einer so genannten käsigen Nekrose kommen. In diesem extrazellulären und anaeroben Milieu ist das Wachstum von überlebenden Mykobakterien stark eingeschränkt (JANEWAY, TRAVERS, 2002; BÖCKER et al., 2004).

Die Bildung von Epitheloidzellgranulomen ist abhängig von einer T-Zell-Hilfe und zeigt somit eine intakte Immunantwort an. Umgekehrt deuten umfangreiche Nekrosen auf eine erhöhte Erregervirulenz oder eine Beeinträchtigung der Immunabwehr hin. Trotz Sekundärveränderungen wie Vernarbungen oder Verkalkungen der Granulome können diese immer noch infektiöse Erreger enthalten und bei Immundefizienz, Malnutrition, höherem Lebensalter oder Abhängigkeitserkrankungen aufbrechen und Mykobakterien freisetzen (BÖCKER et al., 2004).

## 2.3 Das Krankheitskontinuum der Tuberkulose-Infektionen

### 2.3.1 Die aktive Tuberkulose-Infektion

Die einfachste Unterscheidung von Tuberkulose-Stadien ist die Unterteilung in die stattgehabte, erfolgreich behandelte Infektion (treated tuberculosis), die latente Infektion (LTBI; latent tuberculosis infection) und die aktive Erkrankung (active tuberculosis). Nicht jede Person, welche mit *M. tuberculosis* infiziert ist, erkrankt auch. Bei etwa 10% der immungesunden Personen kommt es zu einer Erkrankung mit variablem Verlauf (HEROLD, 2009), die restlichen Individuen sind latent infiziert mit dem Risiko, im Lebensverlauf zu erkranken. Eine Minderung der Immunabwehr wie durch iatrogene Immunsuppression (SESTER et al., 2006; SESTER et al., 2009), terminale Niereninsuffizienz (SESTER et al., 2004), HIV-Infektion (MTEI et al., 2005; GOLETTI et al., 2008), Malnutrition, Alkohol- oder Drogenabhängigkeit (BANDERA et al., 2001; HEROLD, 2009), Tumorerkrankungen oder das Vorliegen einer Silikose (NETTER, BÖTTCHER, 2001) erhöhen das Risiko für eine Primärtuberkulose. Da der Erreger über Tröpfcheninfektion verbreitet wird, ist meist die Lunge primär von der Infektion betroffen. So lag bei den 2008 in Deutschland gemeldeten Tuberkulose-Fällen in 78,7% eine Lungenmanifestation und nur in 21,3% eine extrapulmonale Form vor, wobei hier die Hälfte durch Lymphknotenbefall bedingt war (BRODHUN et al., 2010). Seltener waren Urogenitaltrakt, Knochen, Verdauungstrakt, zentrales Nervensystem, Haut oder andere Organe betroffen. Nach Aufnahme in der Lunge werden die Mykobakterien phagozytiert und von den noch nicht aktivierten Makrophagen zu regionären Lymphknoten im Bereich des Lungenhilus transportiert. Somit können mit Einsetzen der Aktivierung der Makrophagen schon zwei Regionen im Körper von einer granulomatösen Entzündung betroffen sein (BÖCKER et al., 2004). Wenn der Erreger Anschluss zu dem Bronchiensystem erhält, besteht die Möglichkeit, ihn per Husten oder Niesen auszuschleiden und somit weitere Personen zu infizieren. Diese Form wird als offene Tuberkulose bezeichnet und trat 2008 in Deutschland bei 76,5% der Patienten im Gegensatz zur geschlossenen Form auf (BRODHUN et al., 2010). In den meisten Fällen kommt es bei guter Abwehrlage zur Ausheilung des aus dem Primärherd und dem zugehörigen Lymphknotenherd bestehenden Primärkomplexes. Im Rahmen dieser Primärinfektion ist jedoch auch die Verbreitung möglich. So kann der Erreger per continuitatem sich innerhalb der Lunge bis hin zur Pleura ausbreiten (NETTER, BÖTTCHER, 2001; BÖCKER et al., 2004). Über lymphogene und hämatogene Streuung kann jedes Organ befallen werden und später auch Ort einer Reaktivierung sein (NETTER, BÖTTCHER, 2001; BÖCKER et al.,

2004; HEROLD, 2009). Je nach Abwehrlage ist als Manifestation eine Pleuritis tuberculosa, eine Hiluslymphknotentuberkulose oder eine käsige Pneumonie mit Einschmelzungsherden möglich. Selten sind Miliartuberkulose als generalisierte hämatogene Streuung in potentiell alle Organe in Folge hoher Erregerlast und unzureichender Abwehrlage oder eine Tuberkulose-Sepsis möglich (BÖCKER et al., 2004; HEROLD, 2009). Sofern die Infektion überhaupt zu einer aktiven Erkrankung führt, können Symptome wie Husten, Hämoptoe, subfebrile Temperaturen, Nachtschweiß, Abgeschlagenheit oder Gewichtsverlust auftreten. Dieser Symptomkomplex muss auch an ein Malignom denken lassen. Ein Großteil der Patienten ist initial symptomfrei (NETTER, BÖTTCHER, 2001; DEN BOON et al., 2006; HEROLD, 2009), so dass die Diagnosestellung häufig verschleppt wird.

### ***2.3.2 Differenzierung der stattgehabten und latenten Tuberkulose und das Risiko der Reaktivierung***

Patienten können in ihrem Leben auch mehrmals an einer Tuberkulose erkranken. Diese postprimäre Tuberkulose kann durch eine exogene Reinfektion oder eine endogene Reaktivierung bedingt sein und zählt unabhängig von der Ätiologie zu den Formen der aktiven Erkrankung. In Deutschland ist die Reinfektion aufgrund der niedrigen Inzidenz und des damit verbundenen niedrigen Re-Expositionsrisikos selten (HEROLD, 2009). In Studien konnten für andere Niedrig-Inzidenzländer Reinfektionsraten von 0,4% (DOBLER et al., 2008) bis 7% (VAN RIE et al., 1999; BANDERA et al., 2001; JASMER et al., 2004) durch Nachweis unterschiedlicher Stämme des *M. tuberculosis* mittels DNA-Fingerprinting ermittelt werden. In Ländern mit höherer Inzidenz oder bei Patienten mit Migrationshintergrund ist der Anteil an Reinfektionen unter den postprimären Tuberkulosen höher und geht mit einem größeren Risiko für MDR-TB einher (VAN RIE et al., 1999; BANDERA et al., 2001; DOBLER et al., 2008). Eine Reaktivierung hingegen ist bei geschwächter Immunabwehr aus alten Organherden nach erfolgreicher Behandlung einer Tuberkulose möglich und kann noch nach Jahrzehnten auftreten (NETTER, BÖTTCHER, 2001). Auch bei der postprimären Tuberkulose ist mehrheitlich die Lunge betroffen (80%), Verläufe sind nicht selten aufgrund der zu der Reaktivierung führenden Ursachen schwerwiegender (BÖCKER et al., 2004). Risikofaktoren stellen neben einer Abwehrschwäche auch eine zuvor bezüglich Länge oder Regelmäßigkeit unzureichend durchgeführte antituberkulöse Therapie dar. Derzeit wird davon ausgegangen, dass ein Individuum, bei welchem sich das Immunsystem mit dem Erreger auseinandergesetzt hat, auch latent infiziert sein kann, ohne dass es zu einer klinischen Manifestation kommen muss (LTBI). Auch diese Individuen können eine „Reaktivierung“

erfahren, obgleich sich diese klinisch als Erstmanifestation darstellt.

### **2.3.3 Exkurs: Erhöhtes Tuberkuloserisiko bei der Therapie rheumatischer Erkrankungen**

Am Beispiel von rheumatischen Erkrankungen und deren Behandlung soll die eben aufgezeigte Risikokonstellation für die Entwicklung einer postprimären Tuberkulose durch Reaktivierung verdeutlicht werden. Diese entzündlichen Systemerkrankungen mit meist unbekannter Ätiologie sind gekennzeichnet durch Autoimmunreaktionen mit Auftreten autoreaktiver B- und T-Zellen. Im Zuge des Autoimmunprozesses mit Produktion proinflammatorischer Zytokine, Komplementaktivierung und Freisetzung von Entzündungsmediatoren kommt es je nach Erkrankungsart zur Schädigung von Gelenken, Bandstrukturen, Muskulatur, Knochen und anderen Organen (NETTER, BÖTTCHER, 2001; HEROLD, 2009). Durch den lang andauernden therapeutischen Einsatz von Glukokortikoiden und anderen Immunsuppressiva zur Behandlung der Erkrankungen zeigt sich bei der Mehrheit der Patienten eine Defizienz des Immunsystems. Eine neue Therapiemöglichkeit mit so genannten „Biologicals“ hat die Behandlung und den Verlauf rheumatischer Erkrankungen positiv beeinflusst. Zu dieser pharmakologischen Gruppe gehören die so genannten TNF $\alpha$ -Antagonisten; dies sind rekombinant hergestellte Antikörper, Antikörperfragmente oder Fusionsproteine zur zielgerichteten Blockade entzündlicher immunologischer Vorgänge (GOLDBLATT, ISENBERG, 2005; GIBBONS, HYRICH, 2009; LEANDRO, 2009). Dabei ist trotz guter Wirksamkeit zu beachten, dass unter Therapie mit TNF $\alpha$ -Blockern neben potentieller Nebenwirkungen insbesondere das Risiko für eine aktive Tuberkulose bei vorher bestehender latenter Infektion bis zu 8fach erhöht ist (WOLFE et al., 2004; ASKLING et al., 2005; CARMONA et al., 2005; KEANE, 2005; SEONG et al., 2007; DIXON et al., 2010; KATIKIREDDI et al., 2010; SOLOVIC et al., 2010) Aufgrund dessen muss bei Prüfung der Indikation zur Eignung von TNF $\alpha$ -Blockern eine latente oder abgelaufene Tuberkuloseinfektion des Patienten zuvor ausgeschlossen werden. Bei latenter Infektion sollte aufgrund des Reaktivierungsrisikos dann vor TNF $\alpha$ -Inhibition eine medikamentöse Prophylaxe mit Isoniazid (INH) durchgeführt werden. Dabei scheint das Risiko für eine aktive Tuberkulose unter den TNF $\alpha$ -Inhibitoren bei Infliximab und Adalimumab höher zu sein als bei Etanercept (TUBACH et al., 2009; DIXON et al., 2010). Erwähnenswert ist, dass schon der Einsatz von Kortikosteroiden oder „Disease modifying antirheumatic drugs“ (DMARD) bei rheumatischen Erkrankungen mit einer erhöhten Inzidenz für eine aktive Tuberkulose einherzugehen scheinen (YAMADA et al., 2006; SEONG et al., 2007; BRASSARD et al., 2009). Auch Infektionen mit nicht-tuberkulösen Mykobakterien scheinen gehäuft aufzutreten

(WINTHROP et al., 2009). Aufgrund dieser brisanten Risikokonstellation ist es notwendig, alle Patienten vor Behandlung mit TNF $\alpha$ -Inhibitoren auf LTBI zu screenen. Hierbei ist es essentiell, sensitive Verfahren zur Verfügung zu haben, die auch bei immungeschwächten Patienten angewandt werden können.

#### **2.3.4 BCG-Immunsierung und Therapie**

Um einer Tuberkulose, insbesondere der schwerwiegenden Miliartuberkulose oder Meningitis tuberculosa, ursächlich entgegen zu treten, entwickelten Albert Calmette und Camille Guérin am Pasteur Institut von Lille den sogenannten BCG (Bacille Calmette-Guérin)-Impfstoff (DANIEL, 2006). Hierbei handelt es sich um einen attenuierten Lebendimpfstoff, der aus *M. bovis*, dem Erreger der Rindertuberkulose, isoliert wurde (VILLARINO, HUEBNER, 1996). 1921 wurde der Impfstoff zum ersten Mal erfolgreich noch in oraler Form getestet und fand später intrakutan breite klinische Anwendung. Nach dem zweiten Weltkrieg wurde der BCG-Impfstoff in Deutschland regelmäßig zur Immunsierung von Neugeborenen verwendet (STYBLO, FERLINZ, 1994). Aufgrund der günstigen epidemiologischen Entwicklung, der mangelnden Effektivität (VILLARINO, HUEBNER, 1996; FINE et al., 1999) und des Nebenwirkungsprofils (FINE et al., 1999) ist die BCG-Impfung seit 1998 von der Ständigen Impfkommission (STIKO) nicht mehr empfohlen (RKI, 2009). Daneben können bei Tuberkulin-Hauttests falsch positive Ergebnisse bei BCG-Geimpften zu der fälschlichen Annahme eines stattgehabten Kontaktes mit *M. tuberculosis* führen (TISSOT et al., 2005). Derzeit wird BCG in Deutschland nur noch in besonderen Situationen mit erwarteter hoher Exposition zur Impfung verwendet und findet des Weiteren Einsatz in der intravesikalen Immuntherapie bei Urothel-Carcinom der Harnblase (MORALES, 1980).

Neben der Isolierung von infektiösen Patienten und der Einhaltung von Hygiene- und Desinfektionsmaßnahmen zur Verhinderung einer Ausbreitung, muss ein Tuberkulose-Erkrankter einer teilweise mit erheblichen Nebenwirkungen behafteten Pharmakotherapie zugeführt werden. Aufgrund des Aufbaus ihrer Zellwand sind Mykobakterien für viele antibiotische Substanzen resistent. So werden für mindestens sechs Monate regelmäßig einzunehmende Kombinationen der fünf Erstrangmedikamente Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid, Streptomycin und Ethambutol eingesetzt (HEROLD, 2009). Dabei wird Isoniazid auch zur Chemoprävention bei der Verdachtsdiagnose LTBI eingesetzt. Durch zunehmende Resistenzentwicklung muss immer häufiger auch auf Zweitstrangmedikamente mit niedrigerer Wirksamkeit und höherer Nebenwirkungsrate zurückgegriffen werden. Der unzureichende Schutz durch Immunsierung sowie die Entwicklung resistenter Stämme mit

Mangel an wirksamen Medikamenten offenbart auch die Notwendigkeit einer raschen Diagnostik der Tuberkulose und etwaiger Begleiterkrankungen, um die weitere Ausbreitung der Infektionskrankheit sowie die Resistenzbildung zu verhindern.

## **2.4 Diagnostisches Spektrum**

### **2.4.1 Radiodiagnostik und direkter Keimnachweis in der klinischen Routine**

Aufgrund der komplexen Manifestation einer Tuberkulose mit unterschiedlichem Organbefall und teilweise fehlender Symptomatik ist die Diagnostik kein einfaches Unterfangen. Der entscheidende Schritt besteht darin, überhaupt eine Tuberkulose in Betracht zu ziehen. Neben der Berücksichtigung der Anamnese und der klinischen Symptomatik kann das Röntgen des Thorax tuberkulosespezifische Hinweise liefern. So deuten durch Verflüssigung von Nekroseherden entstandene Hohlräume (Kavernen), Rundherde, Pleuraergüsse sowie Vergrößerung oder Verkalkung von Lymphknoten auf eine Tuberkulose hin. Obgleich Röntgenbefunde der Lunge im Vergleich zur klinischen Symptomatik sensitiver zur Diagnose einer Tuberkulose geeignet sein mögen (DEN BOON et al., 2006), können die erhobenen Befunde auch bei anderen pulmonalen Prozessen oder Systemerkrankungen auftreten und nur schwer unterschieden werden (NETTER, BÖTTCHER, 2001). Zudem gehen röntgenologische Untersuchungen sowie die zur besseren Differenzierung suspekter Strukturen teilweise notwendige Computertomographie mit einer Strahlenbelastung für den Patienten einher.

Beweisend für eine Tuberkulose ist hingegen der direkte Keimnachweis aus verschiedenen Materialien wie Sputum oder Magensaft. Aufgrund des hohen Lipidanteils in der Zellwand lassen sich Mykobakterien mit Standardfärbungen wie der Gram-Färbung nicht anfärben, dafür sind Spezialfärbetechniken wie die Ziehl-Neelsen-, Kinyoun- oder Fluoreszenz-Färbung notwendig (BÖCKER et al., 2004). Da sich die so angefärbten Bakterien weder durch Säure- noch Alkoholbehandlung wieder entfärben, spricht man von säurefesten Stäbchen (BÖCKER et al., 2004), welche sich ab einer Nachweisgrenze von  $10^4$  Bakterien/ml mikroskopisch nachweisen lassen (HEROLD, 2009). Bei einem positiven Befund ist jedoch eine Verwechslung mit anderen säurefesten Stäbchen (Umweltmykobakterien) möglich. Da ein negativer Befund eine Tuberkulose nicht ausschließt, ist die Kultur Goldstandard (BRODHUN et al., 2010). Eine kulturelle Anzucht ist mit 3 bis 4 Wochen auf Festmedium und mit 1 bis 2 Wochen in Flüssigkultur zwar sehr zeitintensiv, aber auch wegen der notwendigen Resistenzbestimmung unentbehrlich (HEROLD, 2009). Ein positiver Befund in

der Mikroskopie geht aufgrund der höheren Bakterienzahl mit einem beträchtlichen Infektionsrisiko durch den Patienten für andere einher, allerdings ließen sich 2008 durch die Mikroskopie im Vergleich zur Kultur nur 44,4% versus 81,2% der Lungentuberkulosen nachweisen (BRODHUN et al., 2010). Ein ähnlich hohes Ergebnis wie die Kultur liefern die sogenannten Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken (NAT), bei welchen rasch in spezialisierten Abteilungen meist durch PCR mykobakterielles Erbgut nachgewiesen werden kann (BRODHUN et al., 2010). Sowohl der NAT als auch der Kultur entgehen jedoch die Fälle, bei denen durch Probengewinnung keine Keime extrahiert werden können oder bei denen sich die Erkrankung in einem anderen Organsystem manifestiert. Mittels sogenanntem DNA-Fingerprinting ist die Unterscheidung von Infektionsketten und die Schnellidentifizierung von bestimmten Stämmen des *M. tuberculosis*-Komplex möglich (VAN RIE et al., 1999). Häufig ist zum direkten Erregernachweis eine mehrfache Proben-Gewinnung notwendig, teilweise gekoppelt an invasive Eingriffe wie diagnostische Punktionen oder Bronchoskopien. Noch invasiver ist die Sicherung der Diagnose über den histologischen Nachweis von verkäsenden tuberkulösen Granulomen durch Biopsie befallener Organe und birgt damit ein interventionelles Risiko für den Patienten. Um einen Erkrankten rasch einer wirksamen Pharmakotherapie zuführen zu können, werden schnelle und zuverlässige Verfahren zum Nachweis einer Infektion mit Tuberkuloseerregern benötigt.

#### ***2.4.2 Die immunologische Diagnostik: Von der zellulären Immunantwort in vivo zur spezifischen Reaktivität in vitro***

Klinische Symptomatik und Befunde in bildgebenden Verfahren ermöglichen es dem Arzt, eine Tuberkulose als Erkrankung in Betracht zu ziehen. Direkte Nachweismethoden sind für die Tuberkulose beweisend, ein negatives Ergebnis schließt jedoch eine Tuberkulose aufgrund der unterschiedlichen Kompartiment- bzw. Organbeteiligung nicht sicher aus. Da bei einer latenten Infektion per definitionem sich kein Keim nachweisen lässt, können direkte Nachweisverfahren hier nicht sinnvoll eingesetzt werden. Bei vielen viralen Erkrankungen lassen sich Virus-spezifische Antikörper aus dem Blut als Zeichen der humoralen Immunantwort nachweisen. Da bei der Tuberkulose jedoch intrazelluläre Prozesse maßgebend sind, spielen serologische Testverfahren aufgrund indifferenter und wenig sensitiver Ergebnisse bislang nur eine untergeordnete Rolle (STEINGART et al., 2007). Der Prototyp einer Nachweismethode für eine zellulär vermittelte Immunantwort in vivo ist der Tuberkulin-Hauttest (JANEWAY, TRAVERS, 2002). Tuberkulin ist ein aus *Mycobacterium tuberculosis* gereinigtes und filtriertes Proteingemisch, welches 1907 durch Clemens von

Pirquet in einem ersten Intrakutantest eingesetzt wurde. Das heute gebräuchliche Verfahren zum Nachweis einer Infektion mit *M. tuberculosis* ist der Hauttest nach Mendel-Mantoux, der als Instrument der Routinediagnostik fest etabliert ist. Dieses in-vivo-Verfahren dient dazu, einen relevanten immunologischen Kontakt eines Individuums mit *M. tuberculosis* nachzuweisen. Einsatz findet der Hauttest vorwiegend zur Diagnostik der latenten Tuberkulose, wobei hier zu berücksichtigen ist, dass durch ein positives Ergebnis nicht eine latente Infektion von einer manifesten Erkrankung unterschieden werden kann (SESTER et al., 2011a). Bei der Anlage des Hauttestes wird hochgereinigtes Tuberkulin (PPD; Purified Protein Derivate) in definierter Menge intrakutan injiziert und löst – eine zelluläre Immunität vorausgesetzt – nach 24 bis 72 Stunden eine Hypersensibilitätsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV) aus. Dabei induzieren inflammatorische CD4-T-Zellen (Th1) über Zytokinexpression von unter anderem  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$  eine lokale Entzündung (TSICOPOULOS et al., 1992; JANEWAY, TRAVERS, 2002), welche klinisch durch eine messbare Verhärtung (Induration) der Haut erfasst werden kann. Bei Umgebungsuntersuchungen von Kontaktpersonen eines Patienten mit offener Tuberkulose kann über die Konversion von negativem zu positivem Hauttest-Ergebnis innerhalb von sechs bis acht Wochen nach Kontakt eine Person als infiziert detektiert werden. Dabei kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, welche dieser als latent infiziert geltenden Individuen tatsächlich Träger lebender Bakterien sind.

Eine Induration von mindestens 5 mm kann qualitativ als positiv bewertet werden, alternativ ist die semiquantitative Beurteilung eines klinisch relevanten Ergebnisses anhand international anerkannter Indurationsstufen in Zusammenschau mit dem Expositionsrisiko und dem Immunstatus möglich. Ein positives Ergebnis weist so eine zelluläre Immunität gegen *M. tuberculosis* nach. Das zusätzliche Vorliegen einer Hautnekrose weist auf eine besonders intensive Immunreaktion hin. In der klinischen Diagnostik haben sich die Indurationsstufen von 5 mm, 10 mm und 15 mm nach Empfehlungen der „American Thoracic Society“ und des „Center for Disease Control“ bewährt (ATS, 2000; ATS-CDC, 2000; ATS, 2001). So gilt beispielsweise eine Induration von 15 mm bei einem Individuum ohne nennenswerte Exposition bei intakter Immunabwehr als ein Positivitätskriterium. Sofern sich keine weiteren diagnostischen Hinweise für eine aktive behandlungsbedürftige Erkrankung ergeben, ist somit von einer latenten Infektion auszugehen, welche unter Berücksichtigung des klinischen Kontextes einer Chemoprävention zugeführt werden sollte.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss generell berücksichtigt werden, dass der Hauttest



auch bei immunkompetenten Personen in gut 10% aller Fälle falsch negativ ist (HAAS, BRODHUN, 2006), der Anteil bei immunkompromittierten Personen liegt deutlich höher (HAVLIR, BARNES, 1999; ATS, 2001; PONCE DE LEON et al., 2005; LUETKEMEYER et al., 2007). Bei aktiver Tuberkulose kann die Rate an falsch negativen Ergebnissen bei bis zu 25% liegen (HOLDEN et al., 1971; SESTER et al., 2011a). Da Tuberkulin nicht *M. tuberculosis* spezifisch ist, können sich nach BCG-Impfung oder Kontakt zu nicht dem *M. tuberculosis*-Komplex gehörenden Mykobakterien auch falsch positive Ergebnisse zeigen (DANIEL, JANICKI, 1978; HARBOE, 1981; TISSOT et al., 2005). Der Hauttest kann daher trotz der breiten klinischen Anwendung aufgrund der eingeschränkten Aussagekraft nicht als zuverlässiger Goldstandard zum Nachweis eines stattgehabten Kontaktes bezeichnet werden. Da der Hauttest jedoch auf dem Nachweis einer zellulären Immunantwort basiert, wurden in den letzten Jahren neue Verfahren entwickelt, die eine Hauttest-Reaktion in vitro im Blut simulieren: Antigenpräsentierende Zellen können Antigene aufnehmen, prozessieren und als Peptide auf der Zelloberfläche spezifischen T-Lymphozyten präsentieren, welche dadurch aktiviert werden (JANEWAY, TRAVERS, 2002). Diese Aktivierung der in der Vergangenheit sensibilisierten CD4-T-Zellen lässt sich durch Detektion von Aktivierungsmarkern und Zytokinen auch außerhalb des Körpers messen. Da dies außerhalb des biologischen Gefüges ohne den Einfluss anderer Erreger, zirkadianer Rhythmik und körpereigener Hormone und unter günstigen stimulatorischen Bedingungen geschieht, könnte man eine höhere Güte der gemessenen Reaktivität annehmen.

## **2.5 Nachweis zellulärer Immunität in vitro durch spezifischen Reaktivitätsnachweis**

### **2.5.1 Methodik des Reaktivitätsnachweises**

Der Nachweis einer spezifischen T-Zell Reaktion in vitro kann durch verschiedene Verfahren gelingen. Die meisten Testsysteme detektieren reaktive Zellen nach Stimulation von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) mit spezifischen Antigenen durch Nachweis von IFN $\gamma$ . Diese IFN $\gamma$ -Release-Assays (IGRA) wurden in den letzten Jahren im Bereich der klinischen Diagnostik von Infektionskrankheiten kommerzialisiert und als Alternative zum etablierten Hauttest evaluiert. Nach einer in-vitro-Stimulation von Vollblut oder PBMC kann IFN $\gamma$  entweder aus dem Überstand (ELISA-basierte Testsysteme) oder lokal in einer Mikrotiterplatte an spezifische Antikörper gebunden (ELISPOT-Assays) nachgewiesen werden. Ein positiver Nachweis von IFN $\gamma$  korreliert so mit der Reaktivität spezifischer CD4-T-Zellen und kann damit eine spezifische Immunität beweisen (COBANOGLU et al., 2007; CONNELL et al., 2008; JANOSSY et al., 2008; CASAS et al., 2009). Zur Aktivierung

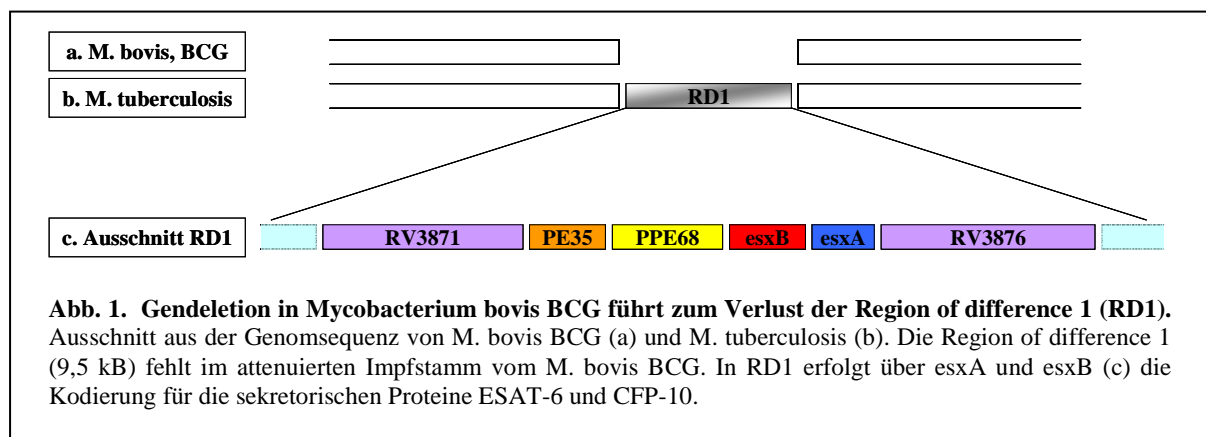
spezifischer Zellen ist bei beiden Verfahren eine Antigenstimulation von 16 bis 24 Stunden notwendig. Bei dem ELISPOT-Assay (enzyme linked immuno spot) müssen zunächst PBMC vor der Stimulation separiert werden. Nach Antigenstimulation kommt es zur Bindung des durch reaktive T-Zellen exprimierten IFN $\gamma$  an spezifische Antikörper auf dem Boden einer Mikrotiterplatte. Nach Auswaschen der Zellen lässt sich die Zytokinproduktion als Zeichen der spezifischen Aktivierung über eine an Sekundärantikörper gekoppelte Enzym-Substrat-Reaktion als sichtbares Präzipitat (Spot) nachweisen. Die Anzahl der Spots in einem Well entspricht der Anzahl der reaktiven Zellen. Bei den ELISA-basierten Assays (QuantiFERON) wird die Stimulation im Vollblut durchgeführt und die IFN $\gamma$ -Sekretion mittels ELISA aus dem Überstand gemessen, dabei können jedoch keine genauen Rückschlüsse auf die Anzahl der sezernierenden Zellen gezogen werden.

Wir selbst entwickelten eine Kurzzeitstimulation direkt aus Vollblut ohne Isolation von PBMC. Bei diesem Vollbut-Assay werden innerhalb von nur sechs Stunden Lymphozyten mit spezifischen Antigenen stimuliert und reaktive T-Zellen nach intrazellulärer Akkumulation von IFN $\gamma$  mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Unter den CD4-T-Zellen werden nach fluorochromgekoppelter Färbung die reaktiven Zellen mit intrazellulär akkumuliertem IFN $\gamma$  und an der Oberfläche exprimiertem Aktivierungsmarker CD69 (MASON et al., 2001; AVGUSTIN et al., 2005) mittels Laser erkannt. Dabei ist die Ermittlung des quantitativen Anteils reaktiver Zellen sowie deren Phänotypisierung möglich. Das Verfahren basiert auf dem durchflusszytometrischen Nachweis CMV- und HIV-spezifischer T-Zellen und soll auch im Rahmen der Tuberkulose-Diagnostik zum Einsatz kommen (SESTER et al., 2000; SESTER et al., 2001; SESTER et al., 2003). Bei Patienten mit Hämodialyse und nach Nierentransplantation konnte bereits eine erste Evaluation stattfinden, obgleich die Etablierung eines klinisch relevanten Grenzwertes, die Verwendung geeigneter Antigene und die Anwendung bei anderen Formen der Immundefizienz noch ausstanden (SESTER et al., 2004; SESTER et al., 2006).

### **2.5.2 Antigene zum Reaktivitätsnachweis**

Bei der Verwendung spezifischer Antigene sind einige Vorüberlegungen anzustellen: Tuberkulin kommt als Gemisch vieler einzelner Proteine bei einer Vielzahl von Mykobakterien vor, so dass keine Erregerspezifität zu erwarten ist. Analog zu einem Tuberkulin-Hauttest kann eine in-vitro-Immunreaktion auf Tuberkulin eine Immunität gegen *M. tuberculosis*, eine Impfantwort durch *M. bovis* BCG (COMSTOCK, 1975; WANG et al., 2002; FARHAT et al., 2006) oder den Kontakt mit anderen nicht-tuberkulösen

Mykobakterien anzeigen (LALVANI et al., 2001). Bei Unsicherheit hinsichtlich des Impfstatus kann die diagnostische Differenzierung jedoch entscheidend für das Durchführen weiterer Diagnostik und ggf. Einleiten einer Therapie bzw. Chemoprophylaxe sein. Um diese Unterscheidung zu ermöglichen, kommen die erregerspezifischen Antigene „Early Secretory Antigenic Target 6“ (ESAT-6) und „Culture filtrate protein 10“ (CFP-10) zum Einsatz. Dabei handelt es sich um sekretorische Proteine, welche über die Gene *esxA* und *esxB* der „Region of difference 1“ (RD1) kodiert werden (BERTHET et al., 1998; LIU et al., 2004). Da diese Region aufgrund einer Deletion in den BCG-Impfstämmen des *M. bovis* nicht vorhanden ist, ist eine Immunreaktion auf diese Antigene als *M. tuberculosis* spezifisch anzunehmen und nicht mit einer Impfantwort zu verwechseln (Abb. 1).



Die Antigene werden des Weiteren ebenfalls von dem *M. tuberculosis*-Komplex zuzuordnenden *M. africanum* sowie von den nicht-tuberkulösen Umweltbakterien *M. kansasii*, *M. szulgai* und *M. marinum* exprimiert (ANDERSEN et al., 2000). Eine Kreuzreaktion bei Infektionen mit den für den Menschen nur selten pathogenen Keimen wäre somit zwar denkbar, aufgrund der bislang verhältnismäßig wenig bedeutsamen Rolle der von diesen Erregern in Deutschland verursachten diagnostizierten Lungenerkrankungen oder der klinisch divergenten Symptomatik wird dieser Aspekt im weiteren nicht gesondert berücksichtigt. ESAT-6 und CFP-10 werden bereits in den kommerziellen IGRA T-SPOT.TB und QuantiFERON Tb-Gold In-tube als Stimuli verwendet. Die durchflusszytometrische Analyse konnte bereits bei immungesunden sowie immundefizienten Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz und nach Transplantation PPD und ESAT-6 reaktive Zellen nachweisen und den Tuberkulin-Hauttest ergänzen (SESTER et al., 2004; SESTER et al., 2006).

### **2.5.3 Mehr als nur zelluläre Immunität: Rückschlüsse von dem Reaktivitätsprofil auf das Erkrankungsstadium**

Neben der Auswahl der Antigene ist zu berücksichtigen, dass die Messung von IFN $\gamma$  eine zelluläre Immunität aufdecken mag, dadurch jedoch nicht auf das Stadium der Erkrankung geschlossen werden kann. Der Nachweis von spezifischer Reaktivität erlaubt nicht die Beurteilung, ob eine aktive, stattgehabte oder latente Infektion vorliegt. Bis zu diesem Punkt dienen der Tuberkulin-Hauttest und die IGRA durch Verwendung von IFN $\gamma$  nur zum Nachweis einer *M. tuberculosis* spezifischen Immunantwort. Aus der Untersuchung chronisch viraler Infektionen ist jedoch bekannt, dass sich reaktive T-Zellen je nach Stadium der Infektion anhand der Zytokinsekretion und Oberflächenmarker unterscheiden. So exprimieren Effektor-T-Zellen alleine IFN $\gamma$ , wohingegen Effektor-Gedächtnis-T-Zellen IFN $\gamma$  und IL-2 und zentrale Gedächtnis-T-Zellen nur IL-2 sezernieren. Die relativen Anteile dieser drei T-Zellarten korrelieren mit der Antigen-Belastung bei chronischer viraler Infektion (PANTALEO, HARARI, 2006; SESTER et al., 2008). Kürzlich konnten Millington et al. 2007 nach aufwändiger Isolierung von T-Zell-Subpopulationen zeigen, dass die relativen Anteile und Frequenzen dieser drei T-Zell-Populationen auch unter den *M. tuberculosis* spezifischen T-Zellen mit der Erreger-Last in infizierten Patienten korrelieren und sich mit Beginn einer antituberkulösen Therapie (unter der Reduktion der Erregerlast) verändern (MILLINGTON et al., 2007). Somit wäre eine Beurteilung des Krankheitsstadiums anhand der Zytokin-Expression reaktiver Zellen auch bei der Tuberkulose möglich. Diese Hypothese ist vortrefflich geeignet, in einem rascheren durchflusszytometrischen Ansatz, bei der durch Mehrfachfärbung verschiedene Aktivierungsmarker in und auf Zellen untersucht werden können, bewiesen oder widerlegt zu werden.

## **2.6 Ziele der Arbeit**

In dieser Arbeit sollte vor dem Hintergrund mangelnder diagnostischer Systeme und zunehmender weltweiter Inzidenz der Tuberkulose die Güte des durchflusszytometrischen Tests zum Nachweis einer zellulären Immunität gegen *M. tuberculosis* evaluiert werden, der sich im Spektrum anderer immunologischer Testverfahren hinsichtlich Sensitivität und Spezifität noch beweisen muss. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde bei einem großen Probandenkollektiv, welches gesunde Kontrollen sowie Patienten beinhaltete, zunächst der Tuberkulin-Hauttest parallel zur durchflusszytometrischen Analyse nach Kurzzeitstimulation durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob wie erwartet die durchflusszytometrische Detektion Tuberkulin-reaktiver T-Zellen dem Hauttest überlegen wäre und in wieweit

Ergebnisse zwischen beiden Testsystemen korrelierten, um ähnlich wie bei dem Hauttest einen klinisch relevanten Grenzwert der reaktiven CD4-T-Zellen zu ermitteln. In einem zweiten Abschnitt wurden auch beide *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 eingesetzt, um deren Nutzen hinsichtlich der Spezifität zu bewerten. Dabei sollte insbesondere der Einfluss des Expositionsrisikos sowie einer Immundefizienz auf den Nachweis einer latenten Infektion (LTBI) bewertet werden. Zum Vergleich wurden parallel an einem kleinen Kollektiv zwei kommerzielle ELISPOT-Assays sowie als Alternativmethode zu den IGRA der Nachweis einer antigen-spezifischen Zellproliferation mittels Thymidin-Proliferationsassay evaluiert. Im dritten Abschnitt der Arbeit erfolgte eine vergleichende Analyse des durchflusszytometrischen Verfahrens und des Hauttests an einem Kollektiv immundefizienter Patienten mit unterschiedlichen rheumatischen Erkrankungen vor dem klinischen Hintergrund einer geplanten pharmakotherapeutischen TNF $\alpha$ -Blockade. Im letzten Abschnitt wurde bei zwei Patientengruppen mit aktiver und stattgehabter Tuberkulose untersucht, inwieweit durch Messung der Expression von IFN $\gamma$  und/oder IL-2 reaktiver Zellen mittels Durchflusszytometrie auf die Aktivität der Erkrankung zu schließen ist.

Zusammenfassend wurden folgende Hypothesen überprüft:

- Die durchflusszytometrische Analyse unter Verwendung von Tuberkulin in vitro ist bei immungesunden und immunkompromittierten Individuen sensitiver als der Hauttest nach Mendel-Mantoux.
- Der durchflusszytometrische Einsatz von ESAT-6 und CFP-10 erhöht die Spezifität des Verfahrens und kann so einen immunologischen Kontakt von einer BCG-Impfantwort unterscheiden.
- Die Durchflusszytometrie liefert valide Ergebnisse im direkten Vergleich mit ELISPOT Assays und Proliferationsassays.
- Die durchflusszytometrische Detektion *M. tuberculosis*-spezifischer T-Zellen ist auch bei immundefizienten Patienten mit rheumatischen Erkrankungen möglich.
- Mittels durchflusszytometrischer Phänotypisierung reaktiver Zellen lassen sich Rückschlüsse auf das Erkrankungsstadium schließen.

### 3 Methoden

#### 3.1 Patienten und Probanden

Von Februar 2006 bis August 2007 wurden 887 Patienten und Probanden durchflusszytometrisch und teilweise mittels anderer Methoden auf ihren Tuberkulose-Status getestet. Dabei kamen erstmals alle drei Antigene PPD, ESAT-6 und CFP-10 zum Einsatz. Sämtliche Patienten und Probanden wurden über die Durchführung der Untersuchung aufgeklärt und gaben hierfür ihr Einverständnis. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Testung von Patienten mit pulmologischen Erkrankungen, bei welchen differentialdiagnostisch eine Tuberkulose in Betracht gezogen werden musste. Daneben wurden Patienten mit rheumatischen Erkrankungen vor Beginn einer Therapie mit TNF $\alpha$ -Inhibitoren sowie medizinisches Personal und gesunde Kontrollen mit jeweils unterschiedlichem Expositionsrisiko getestet. Bei der Gesamtauswertung wurden jedoch auch die Patienten, welche seit 1999 mit Einsatz der Durchflusszytometrie zunächst nur unter Verwendung von PPD in unserer Abteilung getestet wurden, mitberücksichtigt, um eine bessere Aussagekraft über die FACS-Analyse zu erhalten, so etwa Hämodialyse- und Transplantationspatienten. Dabei wurden manche Individuen mehrfach getestet, da erst im Verlauf alle drei im Methodenteil erwähnten Antigene zum Einsatz kamen und zudem partiell Änderungen des Immun- oder Tuberkulose-Status bei einzelnen Probanden aufgetreten waren. Bei insgesamt

**Tab. 1. Charakterisierung der Patienten und Probanden:** Altersverteilung, Immunstatus, Tuberkulose-Status bzw. Expositionsrisiko und Infektion mit anderen Mykobakterien (Mykobakteriose).

<b>Gesamt</b>		<b>n=1885</b>			
<b><u>Altersverteilung</u></b>	<b><u>[Jahre]</u></b>	<b><u>Immunstatus</u></b>	<b><u>[%]</u></b>	<b><u>Tuberkulose-Status</u></b>	<b><u>[%]</u></b>
Mittleres Alter	52,54 $\pm$ 17,41	Immungesund	61,45	Aktive Tuberkulose	1,80
Median	53,64	Immunkompromittiert:		Behandelte Tuberkulose	2,50
Minimum	0,11	Hämodialyse	15,50	Mykobakteriose	0,63
Maximum	94,4	Transplantation	12,54	Expositionsrisiko:	
		Chronisch-entzündlich	7,69	gering	75,96
		HIV	3,25	leicht erhöht	5,81
				erhöht	9,93
				stark erhöht	3,22

1.885 Patienten wurden 2.703 durchflusszytometrische Messungen vorgenommen. Es ergab sich ein Altersdurchschnitt von  $52,54 \pm 17,41$  Jahren, wobei der Anteil an Patienten unter 16 Jahren nur 0,75% betrug. Deren Testung ergab sich alleine aus einer klinischen Notwendigkeit und nicht zu Forschungszwecken. Die Altersverteilung sowie die Angaben zu dem Immunstatus und Tuberkulose-Status sind in Tabelle 1 aufgetragen. Bei Patienten nach Transplantation sowie bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie rheumatischen Erkrankungen, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und Autoimmunerkrankungen bestand in der Regel eine iatrogene Immunsuppression. Personen mit geringem Expositionsrisiko wurden als diejenigen definiert, welche keine Tuberkulose-Infektion durchgemacht hatten, noch nie wissentlich Kontakt zu einem Tuberkulose-Patienten hatten, keine Reisen in Länder mit hoher Inzidenz unternommen hatten und nicht den Berufsgruppen mit regelmäßigem Patientenkontakt angehörten. Das Expositionsrisiko galt bei Probanden, welche sich in einer medizinischen Ausbildung befanden als leicht erhöht. Ein erhöhtes Expositionsrisiko bestand bei Kontakt zu mindestens einem Tuberkulose-Patienten oder bei medizinischem Personal mit häufigem Patientenkontakt, ein hohes Risiko bei Personal in der Mikrobiologie und der Pneumologie bzw. bei lange andauernder und/oder mehrfacher Tuberkulose-Exposition in unmittelbarer Umgebung zu einem Erkrankten.

### **3.2 Software und Statistische Analyse**

Zur Datenverarbeitung und Auswertung wurden folgende Software-Programme verwendet: CellQuest (Messung und Auswertung der durchflusszytometrischen Daten), GraphPad Prism 4.03 (statistische Auswertung und graphische Darstellung von Daten), Microsoft Access (Datenbank zur Verwaltung von Reagenzien, Probandendatenbank inkl. experimenteller Daten), Microsoft Excel (statistische Auswertung, graphische Darstellung von Daten), Microsoft Powerpoint (graphische Darstellung von Daten), Microsoft Word (Textverarbeitung) und Endnote 7.0 (Textverarbeitung und Literaturverzeichnis).

Die Daten wurden, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung angegeben. Bei Korrelationen wurde, sofern nicht anders angegeben, der Korrelations-Koeffizient nach Spearman berechnet. Desweiteren wurden bei Vergleich von zwei Gruppen der Mann-Whitney-Test, beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen der ANOVA test mit Dunn's Post-Test durchgeführt. Der Chi-Quadrat-Test wurde zum Vergleich kategorischer Daten verwendet und als Maß der Übereinstimmung wurde der Kappa-Koeffizient berechnet. Zur Ermittlung von Grenzwerten wurden Receiver operating characteristic (ROC) Analysen eingesetzt.

### 3.3 Materialien und Reagenzien

Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über die für die Versuche benötigten Substanzen, Reagenzien und Materialien. In Tabelle 2 sind die verwendeten Puffer, Zellmedien und Lösungen und ihre Zusammensetzung angegeben. Über die für die Zellstimulationen verwendeten Antigene und Kostimulantien und ihre Konzentrationen informiert Tabelle 3. Die restlichen benötigten Reagenzien sind in Tabelle 4 und die verwendeten Geräte und Materialien in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tab. 2. Zusammensetzung und Einsatz von Puffern, Zellmedien und Lösungen.**

<u>Substanz</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Einsatz</u>
FACS-Puffer	PBS + 5% FCS + 0,5% BSA + 0,07% NaN <sub>3</sub>	Waschpuffer
SAP-Puffer	PBS + 5% FCS + 0,5% BSA + 0,07% NaN <sub>3</sub> + 0,1% Saponin	Intrazelluläre Färbung
Nährmedium	RPMI 1640 + 1% Gln + 1% Pen/Strep + 5% AB-Serum	ELISPOT, Proliferationsassays
Brefeldin A	Stocklösung 5 mg/ml in Ethanol	Stimulation
EDTA	Stocklösung 20mM/ml in Aqua dest.	Fixierung
PFA-4%	Stocklösung 40 mg/ml Paraformaldehyd in PBS	Fixierung PBMC
PFA-1%	25 ml PFA-4% + 75 ml PBS	Fixierung
Lysing-Solution	50 ml Lysing Solution (10fach) + 450 ml Aqua dest.	Fixierung
Saponin-5%	2 g Saponin + 0,28 ml NaN <sub>3</sub> (10 %) + 39,7 ml PBS	Intrazelluläre Färbung
Tritium-Thymidin	Stocklösung 40μCi/ml	Thymidin-Proliferation

**Tab. 3. Konzentration der Stimulantien und Kostimulantien.**

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration pro ml Ansatzvolumen</u>	<u>Hersteller</u>
Lösungsmittel	22,22 μl	Chiron Behring, Marburg
PPD	22,22 μl	Chiron Behring, Marburg
ESAT-6	31,33 μl	Lionex, Braunschweig
CFP-10	31,33 μl	Lionex, Braunschweig
CMV-Kontroll-Antigen	32 μl	Virion/Serion GmbH, Würzburg
CMV-Antigen	32 μl	Virion/Serion GmbH, Würzburg



<u>Substanz</u>	<u>Konzentration pro ml Ansatzvolumen</u>	<u>Hersteller</u>
CMV-Kontroll-Antigen	32 µl (Langzeitstimulation)	BioWhittaker, Walkersville
CMV-Antigen	32 µl (Langzeitstimulation)	BioWhittaker, Walkersville
SEB	2,5 µl, Stocklösung 1mg/ml H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, Steinheim
α-CD28	1 µg, Stocklösung 0,5mg/ml	BD Biosciences, Heidelberg
α-CD49d	1 µg, Stocklösung 1mg/ml	BD Biosciences, Heidelberg

**Tab. 4. Weitere benötigte Materialien und Reagenzien.**

<u>Substanzen/Materialien</u>	<u>Hersteller</u>
<sup>3</sup> H-Thymidin	Amersham Bioscience, Piscataway
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
BFA (Brefeldin A)	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA (Bovines Serumalbumin)	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
ELISPOT T-SPOT.TB Kit	Oxford Immunotec, Oxford
ELISPOT Assay Kit ELSP 5000 IFN $\gamma$	AID, Straßberg
Essigsäure (CH <sub>3</sub> -COOH)	Sigma-Aldrich, Steinheim
FACS Clean, FACS Flow, FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg
FCS (fetal calf serum)	BioWhittaker, Walkersville
FicoLite-H Separation Medium (Human)	Linaris, Wertheim-Bettingen
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Serva, Heidelberg
PBS (phosphate buffered saline)	Linaris, Wertheim-Bettingen
Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich, Steinheim
RPMI 1640 Zellkulturmedium	Biochrom AG, Berlin
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid (30 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-Heparin	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

**Tab. 5. Geräte und Verbrauchsmaterialien.**

<u>Geräte und Verbrauchsmaterialien</u>	<u>Hersteller</u>
48-Well-Platte (Flachboden)	Greiner, Frickenhausen
96-Kanal-Pipette	DBM Scientific, San Fernando
96-Well-Platte (Rundboden)	Greiner, Frickenhausen
Autoklav (Systec 2540 EL)	Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wetttenberg
Brutschrank (CO <sub>2</sub> -Auto-Zero)	Heraeus, Hanau
Edelstahl Isolierflaschen	Emsa GmbH, Emsdetten
Einweg-Stabpipetten "Costar Stripette" (1 - 25 ml)	Corning, New York
Elektrische Pipettiergeräte (Pipetboy plus)	Integra Biosciences, Fernwald
Elektrische Pipettiergeräte (Pipetus-akku)	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Erntegerät (Cell Harvester)	Inotech, Basel
FACSscan Durchflussszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
FACS-Röhrchen (5 ml Polypropylen- und Polystyren; Rundboden)	BD Biosciences, Heidelberg
Falcons (15 ml; 50 ml)	Greiner, Frickenhausen; Sarstedt, Nürnbrecht
Faltenfilter (Ø15 cm; 32 cm)	Schleicher & Schnell GmbH, Dassel
Geschliffene Deckgläser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Heizplatte	Fisher Scientific, Schwerte
Kanülen (26 G1/2)	Becton Dickinson S.A., Madrid
Kanülen, Butterflies (21 G)	Sarstedt, Nürnbrecht
Kolbenhubpipetten (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Abimed, Langenfeld
Leukozytenfilter PALL RCXL2	PALL Medical, England
Mehrkanalpipette (Multi-Mate 300 µl)	Abimed, Langenfeld
Mikroskop Nikon TMS	Nikon, Düsseldorf
Milli-Q UF Plus	Millipore, Schwalbach
Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammern	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Parafilm	NeoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (10 µl; 100 µl; 1000 µl)	Greiner, Frickenhausen; Sarstedt, Nürnbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Greiner, Frickenhausen
S-Monovetten EDTA (2,7 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht
S-Monovetten Li-Hep (2,7 ml; 4,7 ml; 9 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht
S-Monovetten NH <sub>4</sub> -Hep (4,7 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht
Solid Scintillator (Microbeta 1450)	Wallac OY, Turku
Spritzen (1 ml; 20 ml)	Becton Dickinson S.A., Madrid
Sterile Gaze	Fink & Walter GmbH, Merchweiler
Sterile Werkbank Clean Air Type DLF BSS4	Clean Air Technik bv, Woerden, NL
Sterile Werkbank Tecnoflow	Integra Biosciences, Fernwald
Szinillationswachsplatten (Meltilex A)	Wallac OY, Turku
Szintillationsfilter (Printed filtermat A)	Wallac OY, Turku
Tuberkulinspritze mit Spardorn (1 ml)	Dispomed, Gelnhausen
Vacusaft Absauggerät	Integra Biosciences, Fernwald
Vortex Mixer (neoLab 7-2020)	NeoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Zentrifuge (Megafuge 1.0R)	Heraeus, Hanau
Zentrifuge (Spectrafuge Mini)	Labnet, Woodbridge

### **3.4 Grundprinzipien**

Im Folgenden werden jeweils zunächst die Prinzipien der für diese Arbeit essentiellen Arbeitstechniken kurz umrissen, deren Verwendung wichtige Grundlagen für die Umsetzung der diversen Untersuchungen darstellen. Die einzelnen Methoden werden im Anschluss ausführlich erläutert.

#### **3.4.1 Stimulation**

Grundlage für die meisten der hier durchgeführten Versuche ist die Stimulation von sensibilisierten CD4-T-Zellen auf einen spezifischen Stimulus. Verwendet wurden hierzu Leukozyten direkt aus Vollblut oder PBMC nach vorausgehender Separation. Es wurden Kurzzeitstimulationen zur Quantifizierung und phänotypischen Charakterisierung reaktiver T-Zellen und Langzeitstimulationen zur Analyse der Zellproliferation durchgeführt.

#### **3.4.2 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie mittels FACS-Gerät (fluorescence-activated-cell-sorter) dient der quantitativen und qualitativen Charakterisierung von Zellen. Dabei werden die Anzahl, Art der Zellen und deren Expressionsdichte von Oberflächen- und intrazellulären Molekülen analysiert. Die Durchflusszytometrie liefert so den eigentlichen Nachweis einer erfolgreichen Stimulation im Sinne einer Zellaktivierung oder –proliferation.

Die Zellen einer Probe befinden sich in einem flüssigen Medium und werden hintereinander an einem Laser vorbeigeführt. Entsprechend des Streuwinkels des vom Laser ausgesandten monochromatischen Lichts an den Zellen, lassen sich zunächst allgemeine Informationen gewinnen: Durch das nach vorne abgelenkte Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter; FSC) lassen sich die Zellen der Größe nach charakterisieren. Das in einem 15-150°-Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht (Sidescatter; SSC) erlaubt eine Aussage über die Granularität der Zellen.

Intra- und extrazelluläre Strukturen (Rezeptoren oder Zytokine) können im Vorfeld mit spezifischen Antikörpern markiert werden. Die Antikörper sind gekoppelt an diverse Fluorochrome, welche sich bei der Analyse durch den Laser anregen lassen und Licht einer charakteristischen Wellenlänge emittieren. Durch Umwandlung der Emission über ein Spiegel-Filter-System in ein spezifisches Signal kann dadurch auf das Vorhandensein und die zahlenmäßige Expression von Molekülen auf und in jeder einzelnen Zelle geschlossen werden. Bei dem hier verwendeten FACScan Durchflusszytometer mit zwei Lasern konnten bei jeder Messung bis zu vier Fluoreszenzen zur Zellcharakterisierung eingesetzt werden.

Tabelle 6 gibt einen Überblick über die Eigenschaften der von uns in der Durchflusszytometrie eingesetzten Fluorochrome.

**Tab. 6. Übersicht über die durchflusszytometrisch verwendeten Fluorochrome.**

<u>Fluorochrom</u>	<u>Absorptionsmaximum</u> [nm]	<u>Emissionsmaximum</u> [nm]	<u>Anregungswellenlänge</u> [nm]
Allophycocyanin (APC)	650	660	595; 633; 635; 647
Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)	495	519	488
Phycoerythrin (PE)	480; 565	578	488; 532
Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)	482	678	488; 532

### 3.5 Isolierung der PBMC über Ficollgradienten

#### 3.5.1 Prinzip

Die Anwendung des Ficoll-Dichtegradienten erlaubt die Fraktionierung von humanem Blut in die einzelnen zellulären Bestandteile. Die Ficoll-Lösung fungiert hierbei als Trennmedium. Bei Zentrifugation durchwandern die verschiedenen Zellen entsprechend ihrer Dichte die Ficoll-Phase. Erythrozyten und Granulozyten weisen eine geringere Dichte als das Ficoll-Medium auf und pelletieren am Boden des Röhrchens. Aufgrund der höheren Dichte bilden Monozyten und Lymphozyten (periphere mononukleäre Zellen, PBMC) eine Interphase zwischen Ficoll und Plasma und können so abpipettiert und isoliert werden.

#### 3.5.2 Durchführung

Die Isolierung der PBMC erfolgte in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit einem Volumen von 10 bis 15 ml heparinisiertem Vollblut; bei größeren Volumina wurden diese entsprechend auf mehrere Ficoll-Ansätze verteilt. Der gesamte Vorgang erfolgte unter der Sterilwerkbank: Zunächst wurde das Blut mit gekühltem PBS-0,02%EDTA auf ein Volumen von 35 ml aufgefüllt und durchmischt. Es folgte die vorsichtige Unterschichtung der Blutphase durch langsames Ablassen der Ficoll-Lösung. Zur eigentlichen Zellseparation wurde der Ficoll-Ansatz für 20 Minuten in der auf 4° Celsius gekühlten Zentrifuge bei 2500 rpm zentrifugiert. Dabei war die Bremse ausgeschaltet, um ein Vermischen der verschiedenen Phasen beim Stoppen der Zentrifuge zu verhindern. Der so gewonnene dünne Saum aus PBMC zwischen

Ficoll-Phase und Plasma wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften der Ficoll-Lösung wurde zunächst ein Waschschrift durchgeführt, bei welchem die isolierten PBMC mit PBS-0,02%EDTA auf 50 ml aufgefüllt und für 10 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert wurden. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 30 ml PBS-0,02%EDTA resuspendiert und erneut für 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgesaugt und die Zellen zum Zählen in PBS-0,02%EDTA entsprechend etwa einem Drittel des ursprünglichen Blutvolumens aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl (3.5.3) und erneuter Zentrifugation wurden die benötigten PBMC zur Stimulation in einem definierten Volumen Medium aufgenommen.

### **3.5.3 Zellzählung**

Vor Beginn jeder Stimulation von PBMC oder isolierten Leukozyten wurden die Zellen gezählt, um die für den jeweiligen Versuch benötigte Zellzahl in einem adäquaten Volumen an Medium aufnehmen zu können. Dazu wurden die PBMC bzw. Leukozyten nach Waschen in einem Volumen von 2 bis 5 ml Medium oder PBS-0,02%EDTA aufgenommen. Zum Auszählen wurde aus einem kleinen Volumen dieser Zellsuspension eine Verdünnung mit 3%iger Essigsäure je nach erwarteter Zellzahl im Verhältnis von 1:2 bis 1:10 hergestellt. Verwendet wurde die Essigsäure zur Lyse der noch in der Suspension verbliebenen Erythrozyten, welche bei der mikroskopischen Zählung versehentlich zu den Lymphozyten gezählten hätten werden können. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte lichtmikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer unter Auszählung von mindestens zwei diagonal gegenüberliegenden Großquadraten. Die Berechnung der absoluten Zellzahl pro ml Zellsuspension (C) erfolgte unter der Berücksichtigung des errechneten Mittelwertes der ausgezählten Großquadrate (m) und des Verdünnungsfaktors (VF) entsprechend folgender Formel:

$$C \text{ [Zellzahl/ml]} = m \cdot VF \cdot 10^4$$

## **3.6 Nachweis einer zellulären Immunität durch antigenspezifische Stimulation**

### **3.6.1 Prinzip**

Die antigenspezifische Kurzzeitstimulation ist ein in-vitro-Verfahren zur Testung einer zellulären Immunität auf ein Antigen. Dabei werden Leukozyten aus Vollblut oder zellhaltigem Sekret mit einem spezifischen Antigen zusammengeführt. Das Antigen wird von antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, prozessiert und in Form von Peptiden

auf der Zelloberfläche präsentiert. Die Präsentation erfolgt über MHCII-Moleküle an CD4-T-Zellen. Es kommt zur Interaktion zwischen den APC und den T-Lymphozyten. Sofern diese das Fragment „wiedererkennen“, kommt es zur T-Zell-Aktivierung, nachweisbar durch die Produktion spezieller Zytokine (IFN $\gamma$ ) und Expression von Aktivierungsrezeptoren (CD69). Bei spezifischer Aktivierung kann von einer vorbestehenden zellulären Immunität ausgegangen werden. Reaktive Zellen werden durch Nachweis dieser Zytokine und Aktivierungsrezeptoren in der durchflusszytometrischen Analyse detektiert.

### **3.6.2 *Stimulationsansatz aus Vollblut***

#### **Vorbereitungen**

Pro Stimulationsansatz wurde ein Volumen von 300 bis 450  $\mu$ l heparinisiertes Vollblut stimuliert. Der Ansatz erfolgte bis spätestens 24 Stunden nach Blutentnahme, die Blutprobe wurde bis dahin bei 4°C gekühlt. Pro Versuchsperson erfolgte eine Kurzzeitstimulation mit Lösungsmittel, PPD, ESAT-6, CFP-10 in getrennten Ansätzen. Bei einzelnen Probanden erfolgte zusätzlich auch noch eine Doppelstimulation von ESAT-6 und CFP-10 in einem gemeinsamen Ansatz. Des Weiteren wurde bei einigen Probanden zusätzlich eine Stimulation mit CMV-Antigen (*Cytomegalievirus*), CMV-Kontroll-Antigen (Negativkontrolle) und SEB (Positivkontrolle) durchgeführt.

#### **Durchführung der Kurzzeitstimulation**

Jeder Ansatz erfolgte in einem 15 ml Polypropylen-Reaktionsgefäß: Zu dem benötigten Vollblutvolumen wurden die kostimulatorischen Antikörper  $\alpha$ -CD28 und  $\alpha$ -CD49d in einer Konzentration von je 1  $\mu$ g/ml zugefügt. Anschließend erfolgte die Zugabe des spezifischen Antigens in jeden Ansatz entsprechend der Dosierungen in Tabelle 3. Nach Durchmischung wurde jeder Ansatz mit lose aufgeschraubtem Deckel für einen Zeitraum von 2 Stunden bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. In diesem Zeitraum erfolgte nach Prozessierung und Präsentation des Antigens durch APC die Zytokinbildung durch spezifische aktivierte T-Lymphozyten. Um das Austreten dieser induzierten Zytokine in den Überstand für den weiteren Prozess zu verhindern, erfolgte anschließend die Zugabe von Brefeldin A (BFA) in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml pro Stimulationsansatz. Dadurch wurde der Transport zwischen endoplasmatischem Reticulum und Golgi-Apparat gehemmt und eine Akkumulation der Proteine im Zellinneren erreicht. Es schloss sich eine weitere Inkubation von 4 Stunden im Brutschrank unter den oben genannten Bedingungen an.

Im Anschluss daran wurde zum Lösen von Zell-Zell-Verbindungen und Adhäsionen der

Zellen mit dem Röhrchen EDTA in einer Konzentration von 100 µl/ml einer 20 mM EDTA-Stocklösung (Tab. 2) zugefügt. Nach gründlichem Durchmischen für 10 Sekunden erfolgt eine Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen fixiert. Durch die Fixierung wurden einerseits die Zytokinproduktion gestoppt und andererseits die intrazellulären Proteine denaturiert und miteinander vernetzt. Dies verhinderte einen Verlust der gebildeten Zytokine, welche durch die Durchflusszytometrie später quantitativ und qualitativ den entsprechenden Zellen zugeordnet werden sollten. Zunächst erfolgte die Zugabe von 9 ml Becton Dickinson Lysingsolution pro ml Vollblut. Während der folgenden Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgten einerseits eine Lyse der Erythrozyten und andererseits die oben beschriebene Vernetzung intrazellulärer Strukturen durch Proteindenaturierung. Danach wurden die Proben bei 1300 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in einem Volumen von 2 ml FACS-Puffer (PBS-5%FCS-0,5%BSA-0,07%NaN<sub>3</sub>) resuspendiert und erneut für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in einem Endvolumen von 200 bis 400 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Verwendung des FACS-Puffers diente dabei insbesondere zur Blockierung spezifischer Bindungen.

### **3.6.3 Antikörper-Färbung**

Unter Färbung von Zellen ist das Markieren von zellulären Strukturen durch spezifische Fluorochrom-gekoppelte Antikörper zu verstehen. Dabei werden sowohl die intrazellulär akkumulierten Zytokine (IFNγ, IL-2) als auch extrazelluläre Oberflächenrezeptoren (CD4, CD69) zur späteren durchflusszytometrischen Charakterisierung der Zellen markiert.

Vorab wurde dazu eine Antik rpermischung mit einem Volumen von 50 µl pro Ansatz hergestellt. Die verwendeten Antikörper wurden entsprechend Tabelle 7 in zuvor im Labor austitrierten Konzentrationen eingesetzt. Zuzuglich wurde 1µl Saponin-5% (Tab. 2) zur reversiblen Permeabilisierung der Zellmembranen hinzugefügt. Die Differenz zu dem Volumen von 50 µl wurde durch FACS-Puffer aufgefüllt. Tabelle 7 gibt einen Überblick, mit welchen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern zelluläre Strukturen markiert wurden.

Zunächst wurden 200 µl der Zellsuspension pro Ansatz nach Umf llung in FACS-Röhrchen mit 2 ml SAP-Puffer (PBS-5%FCS-0,5%BSA-0,07%NaN<sub>3</sub>-10,1%Saponin) gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch diesen Vorgang wurden die Zellwände permeabilisiert, so dass auch intrazelluläre Bestandteile durch die Antikörper markiert werden konnten. Die Proben wurden anschließend bei 1300 rpm bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zu den Saponin-behandelten Zellen wurde nun die spezifische

Antikörpermischung (50 µl pro Ansatz) hinzupipettiert und die Proben für 40 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

**Tab. 7. In der Durchflusszytometrie verwendete Fluorochromgekoppelte Antikörper.**

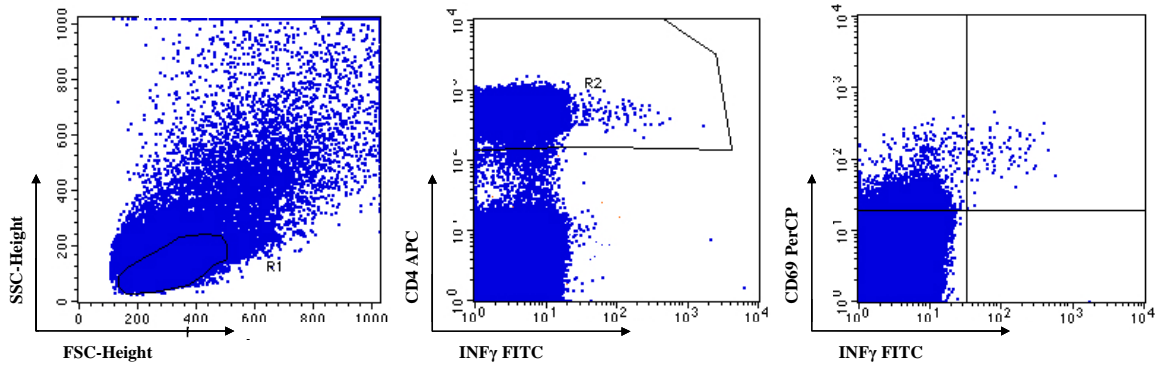
<u>Antikörper</u>	<u>Fluorochrom</u>	<u>Klon</u>	<u>Tier</u>	<u>Menge pro Färbeansatz</u>	<u>Hersteller</u>
α-CD4	APC	SK3	mouse-anti-human	0,5 µl	BD Biosciences
α-CD69	PerCP	L78	mouse-anti-human	2 µl	BD Biosciences
α-INFγ	FITC	4S.B3	mouse-anti-human	0,5 µl	BD Biosciences
α-IL-2	PE	MQ1-17H12	rat-anti-human	2 µl	BD Biosciences
α-CD3	APC	SK7	mouse-anti-human	1 µl	BD Biosciences
α-CD4	PE	SK3	mouse-anti-human	4 µl	BD Biosciences
α-CD8	PerCP	SK1	mouse-anti-human	4 µl	BD Biosciences
α-CD28	unkonjugiert	L293	mouse-anti-human	1 µg/ml Vollblut	BD Biosciences
α-CD49d	unkonjugiert	9F10	mouse-anti-human	1 µg/ml Vollblut	BD Biosciences

In diesem Zeitraum erfolgte die Bindung der Antikörper an die spezifischen Zielstrukturen. Anschließend erfolgte ein Waschschrift zu Entfernung der nicht gebundenen Antikörper und zur Minimierung störender Hintergrundemissionen bei der späteren Messung. Dazu wurden die Zellen in 3 ml FACS-Puffer aufgenommen und wiederum für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in 200 µl PBS-1%PFA aufgenommen. Durch reversible Proteinvernetzung wurde dadurch eine weitere Stabilisierung des gefärbten Zustandes erreicht: Die Proben konnten innerhalb eines Zeitraumes von maximal 24 Stunden durchflusszytometrisch vermessen werden.

### **3.6.4 Bestimmung des Anteils der reaktiven CD4-T-Zellen**

Um den Anteil an reaktiven CD4-T-Zellen zu quantifizieren, wird jede einzelne gefärbte Probe durchflusszytometrisch untersucht. Abbildung 2 gibt einen Überblick über das schrittweise Gaten der reaktiven Zellen. In den aufgetragenen Dotplots sind einzelne Zellen durch farbige Punkte dargestellt. Zunächst wird anhand der durch FSC und SSC ermittelten Zellgröße und Granularität unter allen gemessenen Objekten (Zellen und Zelldetritus) die Lymphozytenpopulation lokalisiert (Gate links) und unter dieser die mittels CD4-APC und IFN $\gamma$ -FITC angefärbten und detektierten CD4-T-Zellen mit IFN $\gamma$ -Produktion bestimmt (Gate Mitte). Im letzten Schritt wird durch die zusätzliche Färbung CD69-PerCP der Anteil der IFN $\gamma$  und CD69 exprimierenden reaktiven Zellen bestimmt (rechts). Der prozentuale Anteil kann hierbei im rechten oberen Quadranten bestimmt werden.





**Abb. 2. Bestimmung der reaktiven INF $\gamma$ -CD69 positiven Zellen in der CD4-Population.** Anhand des Forward Scatters (FSC) und des Side Scatters (SSC) wird unter allen durchflusszytometrisch gemessenen Zellen die Lymphozytenpopulation lokalisiert (links). Unter den Lymphozyten wird zunächst die CD4-T-Zellpopulation gated (Mitte) und darunter der Anteil von Zellen mit Expression von CD69 und intrazellulärer Akkumulation von INF $\gamma$  bestimmt (rechts). Diese reaktiven CD4-T-Zellen sind im rechten oberen Quadranten dargestellt (rechts).

### 3.7 ELISPOT-Assay

#### 3.7.1 Prinzip

Das Prinzip des ELISPOT-Assays beruht auf einer zellulären Zytokinproduktion nach erfolgreicher Stimulation mit einem spezifischen Antigen. Verwendet werden hierbei PBMC, welche zuvor mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus einer Vollblutprobe isoliert werden müssen. Die Stimulation erfolgt in einer mit Antikörpern beschichteten 96-Well-Platte. Die Antikörper sind am Boden des Wells immobilisiert und gegen ein spezifisches Zytokin gerichtet. Nach Aussäen einer definierten Anzahl von PBMC in einzelne Wells erfolgt eine antigenspezifische Stimulation, an deren Ende die Sekretion des gewünschten Zytokins durch reaktive Zellen steht. Werden Zytokine produziert, so binden diese lokal an die am Plattenboden befindlichen Antikörper. Durch mehrmaliges Waschen werden die Zellen, nicht jedoch die Zytokine entfernt. Um die Antikörper-Zytokin-Bindung sichtbar zu machen, werden enzymkonjugierte Sekundärantikörper zur Detektion eingesetzt. Diese Antikörper sind ebenfalls gegen ein Epitop des sezernierten Zytokins gerichtet. Nach Zugabe des Substrates erfolgt eine spezifische Enzym-Substrat-Reaktion, im Zuge derer das entstandene Produkt als sichtbares Präzipitat (Spot) ausfällt. Die Anzahl der mikroskopisch auszählenden Spots pro Well korreliert mit der Anzahl der auf das spezifische Antigen reaktiven Zellen.

#### 3.7.2 Durchführung der ELISPOT-Assays

Die Durchführung in keimarmer Umgebung erfolgte bei uns vergleichend mit zwei ELISPOT-Systemen, welche beide mit gegen INF $\gamma$  gerichteten Antikörpern beschichtet

waren: Verwendet wurden der T-SPOT.TB von Oxford Immunotec und der ELISPOT Assay Kit ELSP 5000 IFN $\gamma$  von AID. In beiden Systemen wurde die gleiche Stimulation durchgeführt: PBMC von 16 Probanden wurden jeweils mit Lösungsmittel, Tuberkulin, ESAT-6, CFP-10, CMV-Kontroll-Antigen, CMV-Antigen und SEB stimuliert. Als *M. tuberculosis* spezifische Antigene ESAT-6 und CFP-10 wurden Reagenzien aus dem jeweiligen Kit in angegebener Konzentration verwendet. Die restlichen Stimuli wurden entsprechend der Konzentrationen in Tabelle 3 eingesetzt. Der Ansatz mit dem CMV-Kontroll-Antigen und SEB erfolgte einfach, der Ansatz der anderen Antigene doppelt. Für beide ELISPOT-Sets wurden pro Well 250.000 PBMC in 100  $\mu$ l Kulturmedium (RPMI-1%Gln-1%P/S-5%AB-Serum) eingesetzt. Die Ermittlung der Spotzahl als Korrelat reaktiver T-Zellen erfolgte durch ein automatisches Reader-System (AID ELISPOT Reader System) mit visueller Nachkontrolle.

### **T-SPOT.TB**

Pro Well wurden 50  $\mu$ l der Antigenlösung vorgelegt und 100  $\mu$ l Zellsuspension (entsprechend 250.000 PBMC) dazupipettiert. Die Platte wurde für 16 bis 20 Stunden erschütterungsfrei im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Zellen durch viermaliges Waschen mit je 200  $\mu$ l PBS pro Well gewaschen. Zur Markierung des lokal sezernierten IFN $\gamma$  erfolgte die Zugabe pro Well von 50  $\mu$ l eines Sekundärantikörpers, konjugiert an alkalische Phosphatase. Anschließend wurde die Platte für eine Stunde bei 2 bis 8°C inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden danach durch weiteres viermaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden 50  $\mu$ l der spezifischen Substratlösung (BCIP/NBT; 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) pro Well zugegeben. Durch Umsetzen des Substrates in unlösliche Präzipitate war innerhalb einer siebenminütigen Inkubation bei Raumtemperatur eine Spotbildung zu beobachten. Die Enzym-Substratreaktion wurde mittels Zugabe von destilliertem Wasser abgestoppt und die Platten über Nacht bis zur Auszählung der Spots getrocknet.

### **AID ELISPOT Assay Kit**

Das Antigen wurde in einem Volumen von 100  $\mu$ l pro Well vorgelegt und 100  $\mu$ l der Zellsuspension (250.000 PBMC) dazupipettiert. Es folgte eine erschütterungsfreie Inkubation von 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Zur Entfernung der Zellen wurde die Platte je dreimal mit 200  $\mu$ l PBS und 200  $\mu$ l PBS/Tween pro Well gewaschen. Es folgte die Zugabe von 100  $\mu$ l eines biotinmarkierten Sekundärantikörpers und anschließender Inkubation der Platten für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Nichtgebundene Antikörper wurden dann durch viermaliges Waschen mit PBS/Tween entfernt. Da der Sekundärantikörper nicht enzymkonjugiert war, erfolgte zunächst ein Zwischenschritt mit Zugabe von 100 µl einer Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Lösung. Während einer weiteren zweistündigen Inkubation in der feuchten Kammer kam es nun zur Bindung zwischen dem mit der Meerrettichperoxidase gekoppelten Streptavidin und dem biotinmarkierten Antikörper. Nach dreimaligem Waschen wurde dann 200 µl einer frisch angesetzten Substratlösung pro Well dazupipettiert. Dazu wurde zunächst eine Verdünnung aus einer AEC-Stocklösung (3-Amino-9-Ethylcarbazol) und Acetat-Puffer im Verhältnis 1:30 hergestellt, die entstandene Lösung dann durch einen Filter mit der Porengröße von 0,45 µm filtriert und schließlich durch Zugabe von 30%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert. Nach Zugabe dieser Substrat-Lösung wurde die Entwicklung der Spotbildung in den Wells beobachtet und die Reaktion bei ausreichend großem Fortschritt nach 15 bis 70 Minuten durch Zugabe von destilliertem Wasser abgestoppt. Nach Trocknung der Platten über Nacht wurde die Spotzahl mittels Reader-System bestimmt.

### **3.8 <sup>3</sup>H-Thymidin-Proliferationsassay**

#### **3.8.1 Prinzip**

Unter einem Proliferationsassay versteht man die experimentelle Quantifizierung einer Zellproliferation. Mit Hilfe der Proliferationsassays kann geklärt werden, ob und wie stark Antigen-reaktive Zellen zur Zellteilung befähigt sind. Die Durchführung erfolgt als Langzeitstimulation von PBMC auf spezifische Stimuli. Als Stimuli wurden Lösungsmittel, PPD, ESAT-6, CMV-Kontroll-Antigen, CMV-Antigen und SEB als Positivkontrolle eingesetzt. Die Quantifizierung einer Proliferationsrate erfolgt durch den Einsatz von <sup>3</sup>H-markiertem-Thymidin, welches bei Zellteilung in die neusynthetisierte DNA eingebaut wird. Es handelt sich hierbei um einen schwachen β-Strahler, mit welchem die Zellen während der letzten 24 Stunden der Stimulation inkubiert werden. Nach Extraktion der DNA kann die radioaktive Strahlung der gesamten Zellpopulation mittels Szintillationszähler gemessen werden.

#### **3.8.2 Durchführung**

Zunächst erfolgte die Separation von PBMC aus einer heparinisierten Vollblutprobe über einen Ficoll-Gradienten. Die Langzeitstimulation erfolgte in einer 96-Well-Platte mit Rundboden, wobei pro Well 100.000 PBMC in 200 µl Kulturmedium eingesetzt wurden. Aufgrund der starken Streuung erfolgte für jedes Antigen ein Dreifachansatz (drei Wells pro

Stimulus). Dabei wurden Lösungsmittel, PPD, ESAT-6, CMV-Kontroll-Antigen, CMV-Antigen und SEB als Stimuli verwendet. Die Randwells wurden wegen starker Austrocknung mit PBS befüllt. Die Wells wurden zur Stimulation zunächst mit 200 µl der Zellsuspension befüllt, anschließend wurde das spezifische Antigen entsprechend der Konzentration in Tabelle 3 hinzupipettiert. Es erfolgte eine Inkubation für 72 Stunden für SEB und für 120 Stunden für die restlichen Antigene im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Jeweils 24 Stunden vor Beendigung der Stimulation erfolgte das Pulsen mit 20 µl je Well einer <sup>3</sup>H-Thymidin-Lösung (entsprechend 10% des Ausgangsvolumen der Zellsuspension). Zur Beendigung der Zellteilung wurde nach der Stimulation die 96-Well-Platte rasch auf -20°C abgekühlt und die Zellen dadurch abgetötet. Vor Messung des radioaktiven β-Zerfalls erfolgte die Überführung des radioaktiven Materials eines jeden Wells auf einen korrespondierenden Punkt auf einem Filterpapier. Dieses wurde anschließend mit Wachs versiegelt, welches einen Szintillationscocktail enthielt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mittels Szintillationszähler als counts/min und korreliert mit der entsprechenden Proliferation der Zellen. Der Stimulationsindex (SI) wurde als Quotient der counts/min der spezifischen Stimulation und der zugehörigen Kontrollstimulation berechnet.

### **3.9 Tuberkulin-Hauttest nach Mendel-Mantoux**

Zur Testung der Versuchsperson auf einen relevanten Kontakt mit dem *Mycobacterium tuberculosis* im Sinne einer zellulären Immunität (Typ IV-Reaktion vom verzögerten Typ) wurde der Hauttest nach Mendel-Mantoux durchgeführt. Verwendet wurde der BiocineTest-PPD Lyophil. Hierzu wurde der Person eine Dosis von 5 I.U. Tuberkulin-Einheiten auf der volaren Unterarmseite injiziert. Das verwendete Tuberkulin wurde als PPD-Gemisch in einem Volumen von 0,1 ml Lösungsmittel gelöst und dann streng intrakutan injiziert. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurde das Hauttest-Ergebnis nach 48 bis 72 Stunden abgelesen: Eine maximale Induration größer als 5 mm im transversalen Durchmesser wurde als positives Ergebnis bewertet, der Durchmesser eines fakultativen Begleiterythems galt dabei als belanglos.

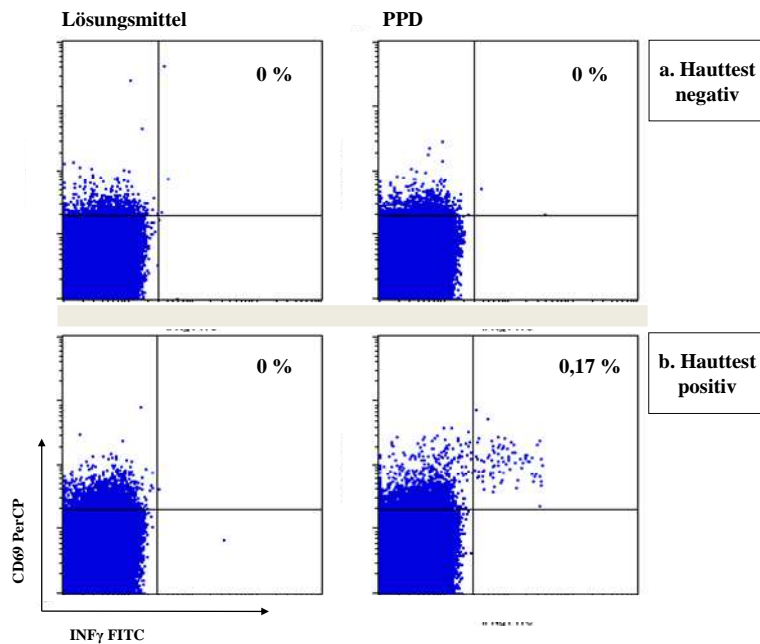
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Der Einsatz des im traditionellen Hauttest verwendeten Tuberkulins zeigt in vitro hohe Effektivität bei der Diagnostik von Tuberkulose-Infektionen

#### 4.1.1 Hochsignifikante Korrelation der mittels Tuberkulin-Stimulation in vivo und in vitro detektierten zellulären Immunantwort

Seit Jahrzehnten findet der Hauttest nach Mendel-Mantoux in der Tuberkulose-Diagnostik breite Anwendung. Um die Güte einer Vollblutstimulation in vitro mit diesem traditionellen in-vivo-Verfahren vergleichen zu können, wurden bei 712 erwachsenen Probanden zeitgleich ein Hauttest nach Mendel-Mantoux sowie eine Kurzzeitstimulation jeweils unter Verwendung des Tuberkulins (PPD; Purified Protein Derivate) als stimulierendes Antigen durchgeführt. Das Kollektiv bestand aus 519 immunkompetenten und 193 immunkompromittierten Individuen. Als immunkompetent wurden die Personen definiert, welche nicht an chronisch-entzündlichen, rheumatischen oder infektiösen Erkrankungen mit einhergehender Beeinträchtigung der Immunabwehr litten. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Patienten mit Einnahme von Immunsuppressiva sowie Hämodialysepatienten. Die Immundefizienz des anderen Kollektivs war durch Hämodialyse, Transplantation und/oder Einnahme von Immunsuppressiva begründet. Den Probanden wurden 5 IU Tuberkulin-Einheiten (Biocine Test-PPD Lyophil oder die Äquivalenzdosis eines anderen Präparates) auf der volaren Seite des Unterarmes injiziert und die maximale transversale Induration nach 48 bis 72 Stunden ausgemessen. Parallel wurde heparinisieretes Vollblut der Probanden im Rahmen einer Kurzzeitstimulation mit Tuberkulin versetzt und der Anteil reaktiver Zellen unter der CD4-T-Zell-Population durchflusszytometrisch detektiert. Dabei wurde intrazellulär akkumuliertes Zytokin IFN $\gamma$  und der extrazelluläre Oberflächenrezeptor CD69 als früher Aktivierungsmarker erfasst. In einen Kontrollansatz wurde jeweils nur Lösungsmittel anstatt des spezifischen Antigens zugegeben.

In der qualitativen Auswertung wurde eine Induration von  $\geq 5$  mm im Hauttest für beide Patientenkollektive und eine PPD Frequenz von  $\geq 0,05\%$  in der Durchflusszytometrie nach Abzug der aktivierten Zellen im Kontrollansatz als positiv gewertet (SESTER et al., 2001). Exemplarisch sind in Abbildung 3 die Zytokinmuster zweier Individuen dargestellt. Bei negativem Hauttest konnte keine PPD spezifische Aktivierung nachgewiesen werden (Abb. 3a), bei dem Individuum mit ausmessbarer Induration  $\geq 5$  mm ließen sich unter der CD4-T-



**Abb. 3. Nachweis PPD-spezifischer CD4-T-Zellen mittels Durchflusszytometrie.** Beispiele für Zytokinmuster in der durchflusszytometrischen Analyse nach Kurzzeitstimulation mit PPD bei einem Individuum mit negativem Hauttest (a) und einer Induration von 11 mm (b). Reaktive Zellen wurden durch Expression von INF $\gamma$  und CD69 durchflusszytometrisch detektiert. Die Frequenz der Zellen, welche in der Kontrollestimulation mit Lösungsmittel (L) reagierten, wurde von den Zellen in der Tuberkulinstimulation (PPD) abgezogen. Bezogen auf die gemessenen CD4-T-Zellen galt eine Frequenz  $\geq 0,05\%$  reaktiver Zellen als positiv.

Zell-Population INF $\gamma$ -CD69 positive Zellen detektieren (Abb. 3b). Bei beiden Probanden war nach der alleinigen Zugabe von Lösungsmittel keine relevante Aktivierung von CD4-T-Zellen detektierbar. Dennoch wurde bei allen nachfolgenden Experimenten der Anteil der Antigen-reaktiven CD4-T-Zellen durch die Subtraktion des Anteils an aktivierten CD4-T-Zellen in der entsprechenden Leerwertkontrolle berechnet.

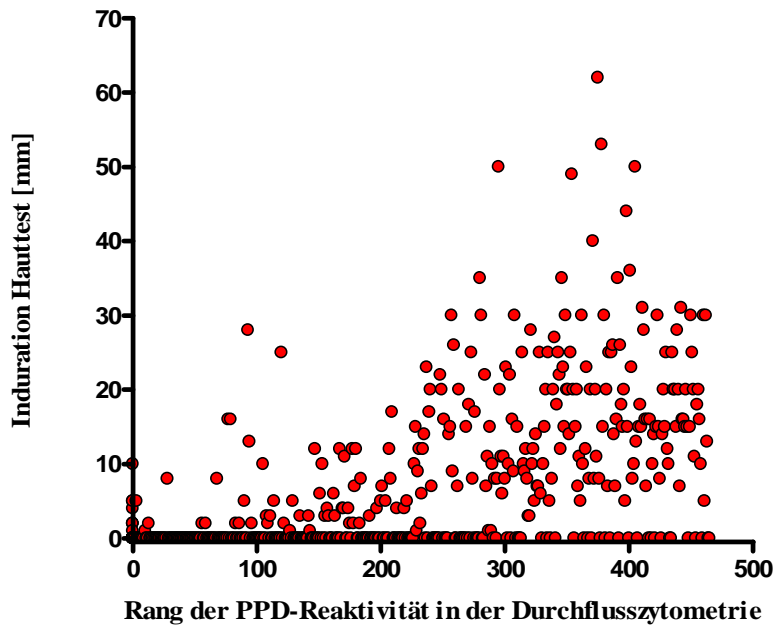
Bei den 519 immunkompetenten Probanden zeigte sich eine enge Korrelation zwischen beiden Verfahren (Tab. 8, Fisher's exact test,  $p < 0.0001$ ). Mit der Berechnung des Kappa-Koeffizienten ergab sich für die Immungesunden eine bessere Übereinstimmung beider Verfahren mit  $\kappa = 0,5$  als bei den Immunkompromittierten mit  $\kappa = 0,34$ . Bei 133 Personen (25,6%) fanden sich diskordante Ergebnisse, wobei 20 Personen mit in der Durchflusszytometrie negativem Ergebnis im Hauttest positiv (Spezifität 90,95%) und 113 der 298 in der Durchflusszytometrie positiv getesteten Personen im Hauttest negativ getestet (Sensitivität 62,21%) waren. Im Kollektiv der immunkompromittierten Individuen (ebenfalls  $p < 0,0001$ , Fisher's exact test) lag die Spezifität des Hauttestes bezogen auf die Durchflusszytometrie bei 96,73%, die Sensitivität jedoch bei nur 38,61% (Tab. 8). Der Umstand, dass bei den immunkompromittierten Patienten mit negativem Ergebnis in der

Durchflusszytometrie nur drei Personen (zwei davon bei genau 5 mm Induration) ein positives Hauttestergebnis aufwiesen, lässt auf einen höheren negativen prädiktiven Wert der Durchflusszytometrie im Vergleich zum etablierten Hauttest schließen.

**Tab. 8. Vergleich des Hauttestes und des durchflusszytometrischen Nachweises einer Reaktivität gegen PPD bei Immungesunden und immundefizienten Patienten.** Während sich bei den immunkompetenten Personen nur wenige diskordante Ergebnisse fanden, bestand bei immunkompromittierten Individuen ein deutlicher Sensitivitätsverlust des Hauttestes gegenüber der Durchflusszytometrie. Eine Induration  $\geq 5$  mm und eine PPD Frequenz  $\geq 0,05\%$  wurden jeweils als positives Ergebnis gewertet.

		Immunkompetente [n=519]			Immunkompromittierte [n=193]		
		Durchflusszytometrie			Durchflusszytometrie		
		PPD < 0,05 %	PPD $\geq 0,05$ %	Gesamt	PPD < 0,05 %	PPD $\geq 0,05$ %	Gesamt
<b>Hauttest</b>	Induration < 5 mm	201 (38,7%)	113 (21,8%)	314 (60,5%)	89 (46,1%)	62 (32,1%)	151 (78,2%)
	Induration $\geq 5$ mm	20 (3,9%)	185 (35,6%)	205 (39,5%)	3 (1,6%)	39 (20,2%)	42 (21,8%)
	Gesamt	221 (42,6%)	298 (57,4%)	519 (100,0%)	92 (47,7%)	101 (52,3%)	193 (100,0%)
Fisher's exact test		p<0,0001			p<0,0001		
$\kappa$ -Werte		0,5			0,34		

Zur besseren quantitativen Vergleichbarkeit der Ergebnisse der in-vivo- und in-vitro-Stimulation korrelierten wir die einzelnen Frequenzen PPD-reaktiver CD4-T-Zellen und die bei dem jeweiligen Individuum im Hauttest ausgemessene Induration. Es zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation im Kollektiv der Immungesunden (Abb. 4) zwischen beiden diagnostischen Verfahren (Korrelationskoeffizienten nach Spearman  $r=0,57$ ,  $p<0,0001$ , CI 0,51–0,63). Bei den Immunkompromittierten ergab sich ein etwas geringerer Korrelationskoeffizient von  $r=0,53$  ( $p<0,0001$ , CI 0,42–0,63; graphisch nicht dargestellt).



**Abb. 4. Hochsignifikante Korrelation der Reaktivität gegen PPD in vivo und in vitro bei immunkompetenten Individuen.** Korrelation des Hauttestes nach Mendel-Mantoux (Induration) versus Frequenz PPD-spezifischer CD4-T-Zellen in der Durchflusszytometrie bei 519 immunkompetenten Individuen. Die Frequenz reaktiver Zellen wurde nach Rang aufgetragen. Es zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation mit  $r=0,5749$  ( $p<0,0001$ , CI 0,5143 – 0,6298).

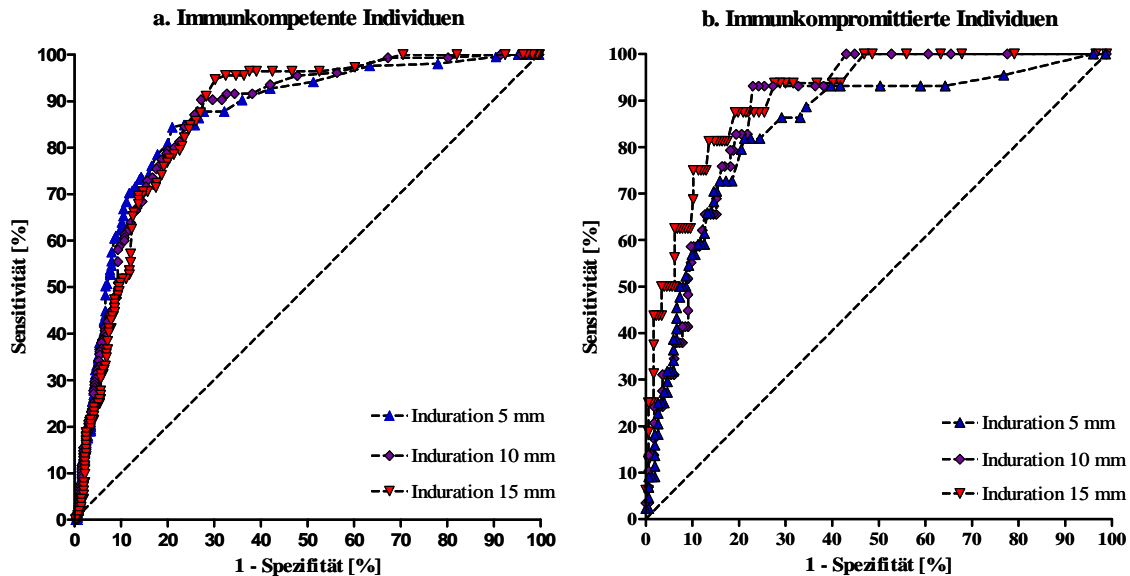
#### **4.1.2 Grenzwertberechnung für die Durchflusszytometrie**

Um für die durchflusszytometrisch gemessene T-Zell-Antwort dem Hauttest vergleichbare Grenzwerte zu etablieren, wurden bei den unter 4.1.1 erwähnten 712 Probanden mittels Berechnung von ROC (receiver operating characteristic) Kurven und des Youde-Index ein Grenzwert für die Durchflusszytometrie ermittelt, bei dem das Verhältnis von Sensitivität zu Spezifität im Vergleich zum konventionellen Hauttest am besten ist. Der maximale Youde-Index beschreibt dabei jenen Punkt der ROC-Kurve, bei dem die Summe von Sensitivität und Spezifität minus 1 am größten ist und der sich daher als Grenzwert des neuen Verfahrens anbietet.

Aufgrund der bekannten maximal 90%igen Sensitivität des Hauttests zum Nachweis einer latenten Tuberkulose ist zu postulieren, dass bei diesem Grenzwert, sollte der durchflusszytometrische Test tatsächlich dem Hauttest überlegen sein, fast alle Personen mit positivem Hauttest erkannt werden sollten. Demgegenüber sollten mindestens 10% der in der Durchflusszytometrie positiven Personen einen negativen Hauttest aufweisen. Es wurden gesondert drei ROC Kurven zur Bestimmung durchflusszytometrischer Grenzwerte berechnet,



die den im klinischen Alltag gebräuchlichen Indurationen  $\geq 15$  mm,  $\geq 10$  mm bzw.  $\geq 5$  mm entsprachen. Dabei erfolgte die Analyse zusammen für alle Individuen (Tabelle 9) und getrennt nach Immunstatus (Abb. 5).



**Abb. 5. Receiver-Operator characteristics (ROC)-Kurven der mittels Durchflusszytometrie bestimmten Frequenz der reaktiven CD4-T-Zellen gegen *Mycobacterium tuberculosis* im Vergleich zu den Ergebnissen des Hauttests.** Bei 519 immunkompetenten Personen (a) und 193 immunkompromittierten Personen (b) wurde die Immunität gegenüber Tuberkulin (PPD) sowohl mit dem Hauttest nach Mendel-Mantoux als auch durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wurden gesondert jeweils drei ROC-Kurven berechnet und die maximale Fläche darunter (AUC) berechnet, jeweils unter der Voraussetzung, dass eine Induration  $\geq 5$  mm,  $\geq 10$  mm bzw.  $\geq 15$  mm als positiv gewertet wurde.

Die AUC (area under the curve) war für alle getesteten Hauttest-Grenzen größer als 0,84 und die maximalen Youde-Indices sowie die damit errechneten Grenzwerte der Durchflusszytometrie lagen sehr dicht zusammen. Graphisch sind die ROC-Kurven getrennt nach Immunstatus in Abb. 5 dargestellt. Bei Betrachtung aller Individuen entspricht eine Hauttest-Induration von 15mm einem Grenzwert PPD-reaktiver CD4-T-Zellen von 0,115% (Tab. 9, AUC 0,87, maximaler Youde-Index 0,65). Bei separater Berechnung des Grenzwertes für Immunkompetente betrug die entsprechende AUC 0,87 und bei Immunkompromittierten 0,91. Dies entspricht bei Immungesunden einem Grenzwert von 0,115% und bei Immunkompromittierten einem Wert von 0,205% der reaktiven CD4-T-Zellen. Der vergleichsweise hohe Wert bei Immunkompromittierten erklärt sich damit, dass eine sehr starke T-Zell-Antwort vorliegen muss, um trotz der Immundefizienz eine Induration von 15 mm zu erreichen.

**Tab. 9. Berechnung von Grenzwerten für die durchflusszytometrische Quantifizierung von Tuberkulin-reaktiven CD4-T-Zellen anhand des Vergleiches zum Hauttest mit 5 mm, 10 mm und 15 mm Induration bei 719 Individuen (immunesund und immunkompromittiert).** Die Fläche unter der ROC-Kurve (area under the curve; AUC) wurde aus dem Vergleich der durchflusszytometrisch bestimmten Frequenzen PPD-reaktiver CD4-T-Zellen in Bezug auf ein positives Hauttestergebnis bei einer Indurationsgrenze von 5 mm, 10 mm bzw. 15 mm berechnet. Die maximale AUC ergab sich mit 0,87 bei der 15 mm-Indurationsgrenze. Dies entspricht einem Grenzwert von 0,115 % reaktiver CD4-T-Zellen.

	Hauttest 5 mm	Hauttest 10 mm	Hauttest 15 mm
AUC	0,86	0,87	0,87
maximaler Youde-Index	0,62	0,64	0,65
Sensitivität [%]	83,94	90,76	94,53
Spezifität [%]	78,49	73,35	70,21
Grenzwert [% reaktive CD4-Zellen]	0,105	0,105	0,115

Zusammenfassend zeigte sich sich für die Kurzzeitstimulation mit Tuberkulin eine hochsignifikante Korrelation zu den Ergebnissen des bisher üblichen Intrakutantests. Darüberhinaus scheint eine erhöhte Empfindlichkeit des durchflusszytometrischen Verfahrens bei immunkompetenten und auch immunkompromittierten Patientenkollektiven vorzuliegen. Die Bestimmung der den standardisierten Indurationsgrenzen zugehörigen Grenzwerte in der Durchflusszytometrie ermöglicht zudem eine sinnvolle Interpretation der Ergebnisse bei der klinisch-diagnostischen Anwendung.

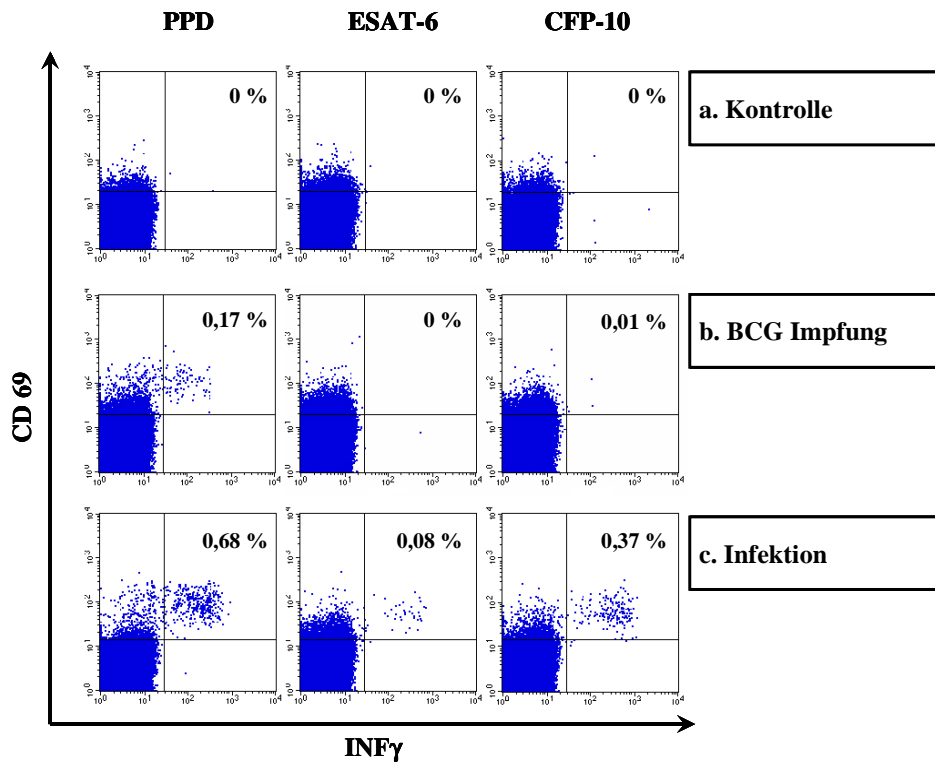
## **4.2 Komplettierung der durch Tuberkulin vermittelten immunologischen Diagnostik der latenten Tuberkulose mittels Einsatz der *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10**

### **4.2.1 Unterscheidung einer durch BCG-Impfung oder durch Kontakt mit *Mycobacterium tuberculosis* induzierten Immunantwort mittels Verwendung von ESAT-6 und CFP-10 im Vollblut-Assay**

Sowohl bei dem etablierten Hauttestverfahren als auch einer in vitro Stimulation mit Tuberkulin ist eine klare Unterscheidung zwischen einer BCG-Impfantwort und einer *M. tuberculosis* bedingten Immunantwort nicht möglich (TISSOT et al., 2005). Um diese für die klinische Beurteilung wichtige Differenzierung zu ermöglichen, wurden zusätzlich die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 im Vollblut-Assay eingesetzt.

Bei 593 immunkompetenten Individuen wurde eine Kurzzeitstimulation mit PPD, ESAT-6 und CFP-10 in getrennten Ansätzen durchgeführt und die Frequenzen reaktiver CD4-T-Zellen

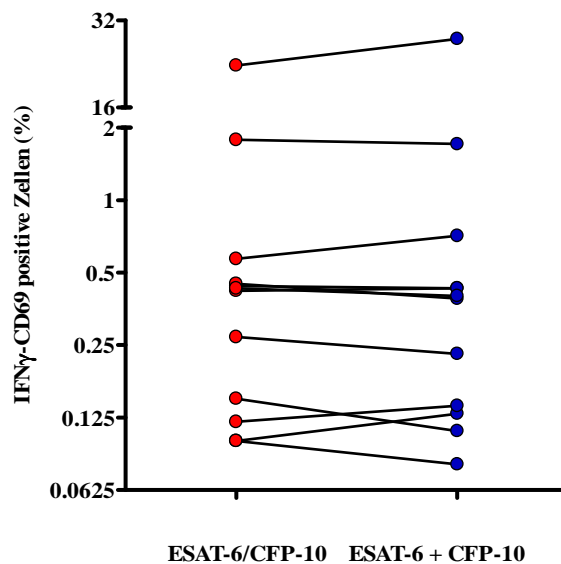
durchflusszytometrisch detektiert. Dabei wurde auch hier ein Anteil von mindestens 0,05% der IFN $\gamma$ -CD69 positiven CD4-T-Zellen als spezifische Aktivierung gewertet. In Abbildung 6 sind repräsentativ drei Beispiele für die Zytokinmuster bei unterschiedlichem Immunitätsprofil dargestellt.



**Abb. 6. Antigen-spezifische Stimulation mit PPD, ESAT-6 und CFP-10 in der FACS-Analyse erlaubt die Unterscheidung zwischen BCG-Impfung und Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis*.** Typische Konstellationen der Frequenzen der IFN $\gamma$ -CD69 positiven reaktiven Zellen (Grenzwert  $\geq 0,05\%$  der CD4-T-Zellen). In der Kontrollstimulation mit Lösungsmittel waren keine reaktiven Zellen detektierbar (nicht gezeigt). Patient (a) zeigt ein Beispiel eines Probanden, bei dem sich keine reaktiven CD4-T-Zellen nachweisen ließen, Patient (b) zeigt eine BCG Impfkonzellation, bei dem nur spezifische CD4-T-Zellen gegen PPD detekrierbar waren. Die Detektion antigenspezifischer CD4-T-Zellen gegen ESAT-6 und CFP10 bei Patient (c) lässt auf einen stattgehabten Kontakt mit *M. tuberculosis* schließen.

Bei der Kontrollperson (Abb. 6a) war kein Kontakt zu *M. tuberculosis* und keine BCG-Impfung bekannt, es ließen sich keine reaktiven CD4-T-Zellen auf die Antigene nachweisen. Bei einer BCG-geimpften Person (Abb. 6b) fanden sich 0,17% PPD-spezifische CD4-T-Zellen, während der Anteil an reaktiven CD4-T-Zellen auf die spezifischen Antigene unter der Nachweisgrenze lag. Im Gegensatz dazu ließen sich bei dem dritten Individuum (Abb. 6c) als Zeichen der spezifischen Immunität gegen *M. tuberculosis* sowohl 0,68% reaktive CD4-T-Zellen gegen PPD als auch 0,08% gegen ESAT-6 und 0,37% gegen CFP-10 detektieren. Dieses Reaktionsprofil ist als Zeichen eines stattgehabten Kontaktes zu werten. Auch Profile mit reaktiven Zellen gegen nur eines der beiden *M. tuberculosis* spezifischen Antigene konnten häufig ermittelt und dieser Kategorie zugordnet werden (graphisch nicht dargestellt).

Für die Beurteilung war es unerheblich, ob sich eine Reaktivität gegen beide oder nur eines der Antigene detektieren ließ, aus praktischem Interesse wollten wir jedoch feststellen, ob sich bei der Verwendung beider Antigene in einem Stimulationsansatz das gleiche Ergebnis erzielen ließ. Wir führten deshalb bei 21 Individuen parallel auch Stimulationsansätze durch, bei denen beide Antigene in einem gemeinsamen Ansatz vorlagen (Abb. 7). Die Frequenzen reaktiver CD4-T-Zellen waren dabei ähnlich hoch wie die Summe der Frequenzen bei getrennter Stimulation. Bei einer hochsignifikanten Korrelation (Spearman  $r=0,96$ ,  $p<0,0001$ , CI 0,89–0,98) wäre so aus Gründen der Praktikabilität bzw. Kostenersparnis auch ein gemeinsamer Stimulationsansatz mit beiden spezifischen Antigenen denkbar, auch wenn dabei die Information verloren ginge, auf welches der beiden spezifischen Antigene die Zellen reagiert hätten.

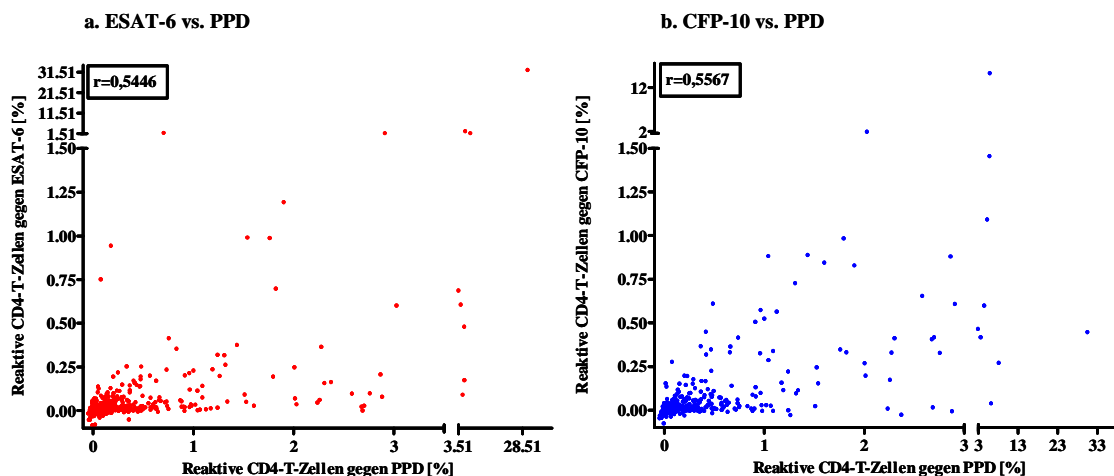


**Abb. 7. Einzel- und Doppelstimulation weisen zelluläre Immunität gleich gut nach.** Es besteht eine sehr gute Korrelation der Frequenzen nach Doppelstimulation (ESAT-6/CFP-10) mit der Summe der Frequenzen nach Einzelstimulation (ESAT-6+CFP-10) mit Spearman  $r=0,96$  ( $p<0,0001$ ; CI 0,89 – 0,98).

#### 4.2.2 Signifikante Korrelation zwischen der Frequenz PPD-reaktiver und *M. tuberculosis*-spezifischer CD4-T-Zellen bei immunkompetenten Individuen

Im Folgenden soll nun der Zusammenhang zwischen der Immunantwort auf PPD und auf die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 ermittelt werden. Hierzu wurde bei 586 Individuen eine Kurzzeitstimulation aus heparinisiertem Vollblut unter Verwendung der drei Antigene (zusätzlich ein Ansatz mit Lösungsmittel als Negativkontrolle) in getrennten Ansätzen durchgeführt. Dabei zeigten die Frequenzen der PPD-reaktiven CD4-T-Zellen eine hochsignifikante Korrelation mit den jeweiligen Frequenzen von CD4-T-Zellen

gegen ESAT-6 (Abb. 8a, Spearman  $r=0,54$ ;  $p<0,0001$ , CI 0,48–0,60) und CFP-10 (Abb. 8b, Spearman  $r=0,56$  ( $p<0,0001$ , CI 0,50–0,61)). Trotz der fehlenden Spezifität des Tuberkulins legt die deutliche Korrelation einen Zusammenhang der detektierten Immunantwort im immunologischen Kontext nahe. Auch untereinander korrelierten erwartungsgemäß die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene signifikant (Spearman  $r=0,53$ ,  $p<0,0001$ , CI 0,47–0,59).



**Abb. 8. Signifikante Korrelation der *M. tuberculosis* spezifischen CD4-T-Zellen mit reaktiven Zellen gegen PPD.** Dargestellt sind die CD4-T-Zell-Frequenzen von 586 immunkompetenten Individuen nach Subtraktion der jeweiligen Frequenzen in der Negativkontrolle. Reaktive Zellen gegen die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 (a) und CFP-10 (b) wurden jeweils gegen die detektierte Reaktivität gegen PPD aufgetragen. Dabei ergab sich jeweils eine hochsignifikante Korrelation ( $p<0,0001$ ) ohne relevante Unterschiede zwischen ESAT-6 (Spearman  $r=0,54$ , CI 0,48–0,60) und CFP-10 (Spearman  $r=0,56$ , CI 0,50–0,61).

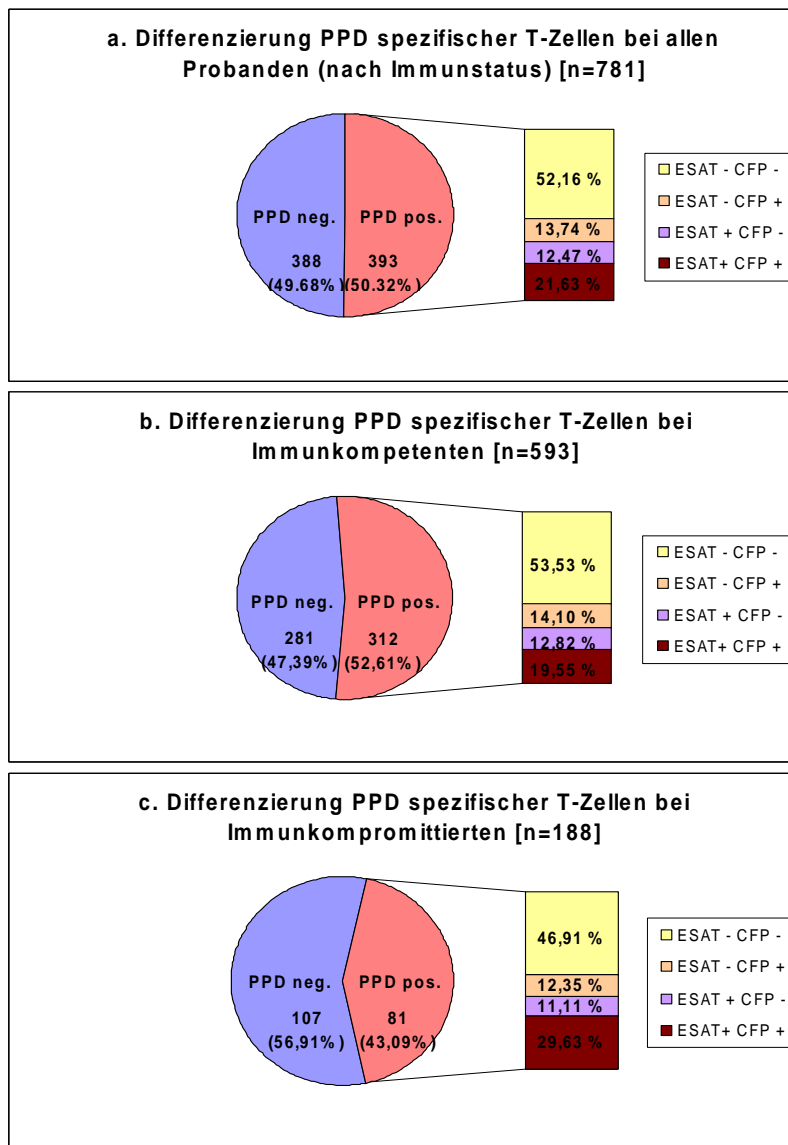
#### 4.2.3 Deutliche Unterschiede in der Verteilung der Reaktionsmuster der Individuen mit reaktiven T-Zellen abhängig vom Immunstatus und Expositionsrisiko

Im Folgenden wurden die Reaktivitätsprofile von 781 Individuen genauer analysiert, um die Häufigkeit von Personen ohne T-Zellreaktivität sowie latent infizierter und von Personen mit dem Profil einer BCG-Impfantwort zu ermitteln.

Bei der quantitativen Beurteilung der jeweiligen Frequenzen PPD-, ESAT-6- und CFP-10-reaktiver CD4-T-Zellen ergaben sich signifikante Unterschiede ( $p<0,0001$ , Kruskal-Wallis-Test); so waren die PPD-Frequenzen der 593 Immunkompetenten mit einem Median von 0,057% (IQR 0,27%) reaktiver Zellen am höchsten, gefolgt von den ESAT-6-Frequenzen (Median 0,010%; IQR 0,034%) und dann den CFP-10 Frequenzen (0,006%, IQR 0,027%), welche in Dunn's multiple comparison test alle signifikant voneinander abwichen ( $p<0,001$ ). Die Frequenzen der 188 Immunkompromittierten waren für ESAT-6 und CFP-10 mit den Medianen 0,008% (IQR 0,033%) und 0,005% (IQR 0,034%) ähnlich hoch wie bei den Immunkompetenten, für PPD etwas niedriger mit 0,036% (IQR 0,143%) (nicht dargestellt).

Bei der qualitativen Analyse der Reaktionsprofile aller getesteten Probanden (Abb. 9a) war der Anteil der Individuen mit und ohne PPD-Reaktivität fast identisch (388 vs. 393 Individuen). Von den 388 Individuen mit nachweisbarer PPD-Reaktivität wiesen 52,16% keine reaktiven CD4-T-Zellen gegen ESAT-6 oder CFP-10 auf und zählen somit zum Kollektiv der mutmaßlich BCG-Geimpften. Die restlichen Individuen zeigten Reaktivität gegen mindestens eines der beiden *M. tuberculosis* spezifischen Antigene, so dass hier von einer latenten Infektion mit *M. tuberculosis* auszugehen ist. Bei den 593 immungesunden Individuen (Abb. 9b) lag der Anteil derjenigen ohne PPD-Reaktivität mit 47,39% etwas niedriger, bei den 188 Immunkompromittierten (Abb. 9c) mit 56,91% höher als bei dem Gesamtkollektiv. Unter den Individuen mit PPD-Reaktivität betrug der Anteil derer ohne Reaktivität gegen ESAT-6 oder CFP-10 bei Immunkompromittierten 46,91% und bei Immungesunden 53,53% (BCG-Impfprofil). Unter den Probanden mit Reaktivität gegen die *M. tuberculosis*-spezifischen Antigen zeigten mehr Immunkompromittierte eine Reaktivität gegen beide Antigene (29,63% versus 19,55% bei Immungesunden). Immunkompromittierte wiesen somit einen geringeren Anteil an PPD-positiven Individuen auf, die jedoch häufiger als Immungesunde gegen ESAT-6 und CFP-10 reagierten.

In Tabelle 10 sind die Antigenantworten bei den Probanden mit negativer PPD-Reaktivität entsprechend ihres Immunstatus dargestellt. Erwartungsgemäß zeigte sich, dass 96,13% aller PPD negativ getesteten Individuen auch keine reaktiven CD4-T-Zellen gegen ESAT-6 oder CFP-10 aufwiesen. Bei diesen Individuen war nicht oder nicht mehr von einer zellulären Immunität – weder gegen *M. tuberculosis* noch gegen *M. bovis* BCG – auszugehen. Unter den wenigen Probanden, welche trotz fehlender PPD-Reaktivität auf die spezifischen Antigene reagierten, waren Individuen mit alleiniger Reaktivität gegen ESAT-6 mit 2,58% am häufigsten vertreten. Relevante Unterschiede zwischen immunkompetenten und immunkompromittierten Individuen fanden sich nicht.

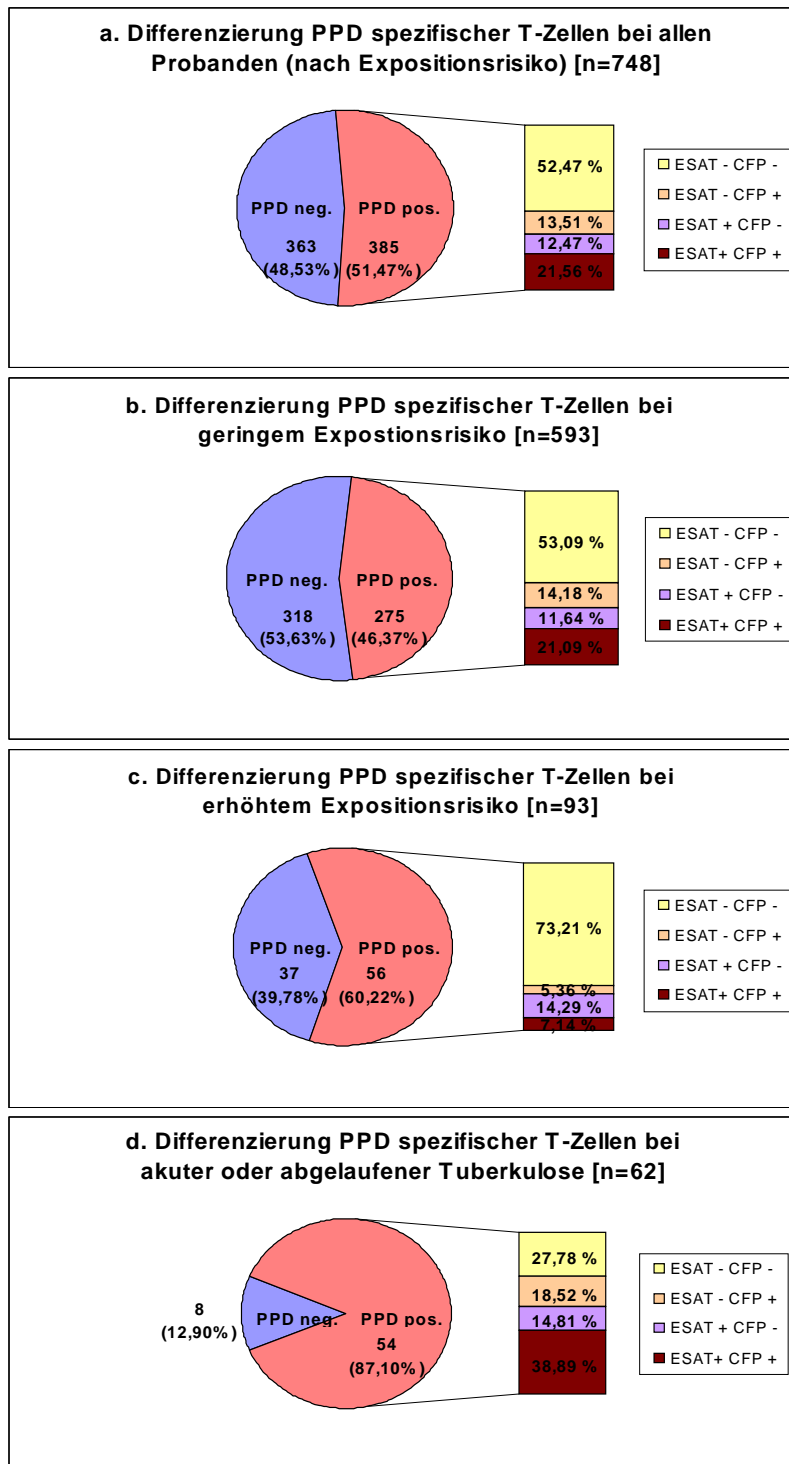


**Abb. 9. Qualitative Analyse der Reaktionsprofile abhängig vom Immunstatus.** Dargestellt wurden die Anteile der Personen mit Reaktivität ( $\geq 0,05\%$ ) und ohne Reaktivität gegen PPD. Unter den PPD positiven Individuen wurde dann die prozentuale Verteilung der reaktiven Zellen gegen ESAT-6 bzw. CFP-10 (*M. tuberculosis* spezifische Antigene) aufgetragen. Es wurden die Gruppen ohne jede Reaktivität, mit Reaktivität gegen ESAT-6 oder CFP-10 und mit Reaktivität gegen beide Antigene unterschieden. Die Beurteilung erfolgte für alle 781 Individuen (a), sowie nach Aufteilung in 593 Immungesunde (b) und 188 Immunkompromitierte (c).

**Tab. 10. Die Mehrheit der PPD negativen Individuen zeigt unabhängig vom Immunstatus keine Reaktivität gegen ESAT-6 oder CFP-10.** Dargestellt wurde die Immunantwort auf die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 bei den 373 Individuen ohne Reaktivität gegen PPD.

	Immungesunde	Immunkompromitierte	Summe
ESAT-6 negativ CFP-10 negativ	270 (96,08 %)	103 (96,26 %)	373 (96,13 %)
ESAT-6 negativ CFP-10 positiv	3 (1,07 %)	0 (0 %)	3 (0,77 %)
ESAT-6 positiv CFP-10 negativ	7 (2,49%)	3 (2,80 %)	10 (2,58 %)
ESAT-6 positiv CFP-10 positiv	1 (0,36 %)	1 (0,94 %)	2 (0,52 %)
Gesamt	281 (100 %)	107 (100 %)	388 (100 %)

Im Folgenden berücksichtigten wir zur Auswertung dieser Reaktivitäts-Verteilung das Expositionsrisiko unabhängig vom Immunstatus (Abb. 10).



**Abb. 10. Reaktivität gegen spezifische Antigene abhängig von der Exposition.** Dargestellt wurde in Kreisdiagrammen zunächst die Auftrennung der PPD negativen und positiven Individuen, unter letzteren dann die Reaktivität auf die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und/oder CFP-10. Es wurden 748 Individuen (a) in verschiedene Gruppen je nach Expositionsrisiko aufgeteilt: Probanden mit mäßigem (b) oder erhöhtem Expositionsrisiko (c) sowie mit akuter oder abgelaufener Tuberkulose (d).

Individuen mit gänzlich nicht bekanntem oder abschätzbarem Expositionsrisiko wurden dabei nicht berücksichtigt. 748 Individuen wurden jeweils einer von drei Gruppen zugeordnet: Eine Gruppe mit Personen mit geringem oder mäßig erhöhtem Expositionsrisiko, eine weitere mit erhöhtem Expositionsrisiko (vgl. 3.1) und eine Gruppe mit bekannter aktiver oder bereits



abgelaufener Tuberkulose. Erwartungsgemäß war der Anteil an Individuen ohne PPD-Reaktivität in der Gruppe mit geringem Risiko am höchsten (53,63%, 318 von 593, Abb. 10b) und in der Gruppe mit erhöhtem Risiko deutlich niedriger (39,78%, 37 von 93, Abb. 10c). In dem Kollektiv mit durchgemachter oder aktiver Tuberkulose zeigten wie erwartet nur acht von 62 Individuen keine Reaktivität gegen PPD (Abb. 10d). Hier wiesen unter den PPD positiven Individuen nur 27,78% keinerlei Reaktivität gegen ESAT-6 bzw. CFP-10 auf, und der Anteil der CD4-T-Zellen mit Reaktivität gegen sowohl ESAT-6 als auch CFP-10 war mit 38,89% am höchsten. In dem Kollektiv mit erhöhtem Expositionsrisiko (Abb. 10c) zeigte sich unter den PPD positiven Individuen ein sehr hoher Anteil ohne Reaktivität gegen ESAT-6 oder CFP-10 (73,21%). Unter allen Individuen (Abb. 10a) lag dieser Anteil nur bei 52,47%. Möglicherweise ist dieser hohe Anteil durch eine immunologische Boosterreaktion einer vorbestehenden BCG-Immunsierung nach erhöhter Exposition bedingt. Eine erhöhte Expositionswahrscheinlichkeit war in dieser Gruppe aufgrund eines hohen Anteils an medizinischem Personal (86,02%) denkbar.

#### ***4.2.4 Die Höhe der Frequenz der reaktiven CD4-T-Zellen gegen PPD ist bedingt vom Vorhandensein reaktiver CD4-T-Zellen gegen die M. tuberculosis spezifischen Antigene***

Bislang zeigte sich, dass die Frequenzen PPD-reaktiver CD4-T-Zellen in der Regel signifikant höher lagen als die Frequenzen reaktiver Zellen gegen die Antigene ESAT-6 und CFP-10. Wir stellten uns im Folgenden die Frage, ob sich die Frequenz PPD-reaktiver CD4-T-Zellen bei Probanden mit Reaktionsprofil eines stattgehabten Kontaktes und Probanden mit BCG-Impfprofil unterscheidet (Abb. 11).

Während der Median der PPD-reaktiven CD4-T-Zellen unter den mutmaßlich Geimpften (E-C-) bei nur 0,027% (IQR 0,08%) lag, war er bei der Gruppe der Doppeltpositiven (E+C+) signifikant höher bei 0,88% (IQR 1,63%;  $p < 0,0001$ ). Dazwischen lagen die Populationen der einfachpositiven E+C- und E-C+ mit Medianen bei 0,22% (IQR 0,44%) bzw. 0,37% (IQR 0,78%) sehr nah zusammen. Die Frequenzen PPD reaktiver CD4-T-Zellen innerhalb der drei Gruppen mit nachweisbarer ESAT-6 oder CFP-10 Reaktivität unterschieden sich jedoch nicht signifikant (Dunn's Multiple Comparison Test).

Dies zeigt, dass Probanden mit *M. tuberculosis* Kontakt eine höhere Frequenz PPD reaktiver T-Zellen aufweisen als Probanden mit reinem BCG-Impfprofil. In Anbetracht der großen interindividuellen Streuung der T-Zell-Frequenzen war jedoch eine Zuordnung zu einer der Gruppen anhand der PPD-Frequenz nicht sicher möglich.

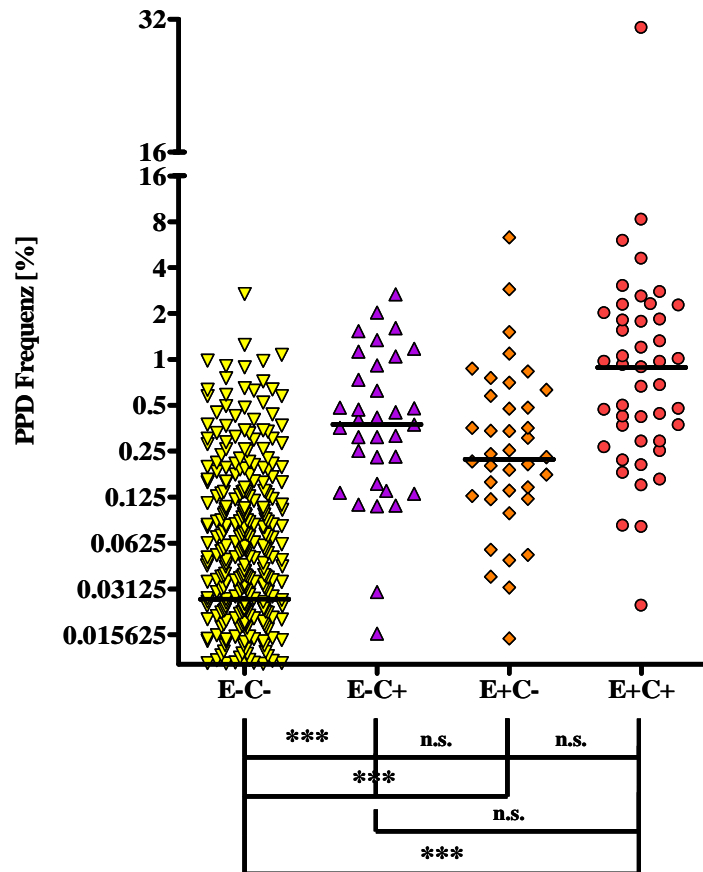
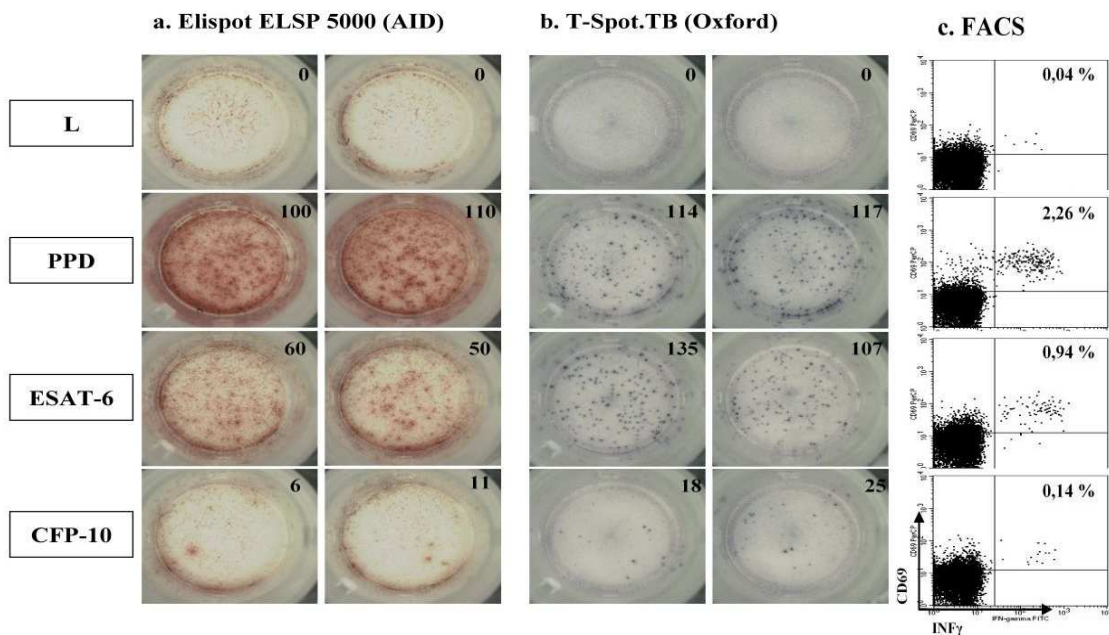


Abb. 11. Die Frequenzen PPD-reaktiver CD4-T-Zellen unterscheiden sich abhängig von der Reaktivität auf die *Mycobacterium tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 signifikant voneinander. Dargestellt wurden von 532 immunkompetenten Individuen die Höhe der Frequenzen (Median) der reaktiven CD4-T-Zellen gegen PPD in Abhängigkeit davon, ob zusätzlich eine Reaktivität gegen ESAT-6 (E) und/oder CFP-10 (C) vorlag.

#### 4.2.5 Signifikante Korrelation zwischen der Durchflusszytometrie und den ELISPOT-Assays zum Nachweis einer zellulären Immunität gegen *Mycobacterium tuberculosis* und *Cytomegalievirus* (CMV)

Seit kurzem haben sich andere in vitro Verfahren zur Diagnostik von Infektionskrankheiten etabliert, die in ähnlicher Weise wie die Durchflusszytometrie eine Reaktivität über die Detektion von exprimiertem IFN $\gamma$  nachweisen. Zur Evaluierung der durchflusszytometrischen Detektion verglichen wir diese mit zwei kommerziellen ELISPOT-Assays. Hierfür wurden der Assay T-SPOT.TB von Oxford Immunotec und das ELISPOT Assay Kit (ELSP 5000 IFN $\gamma$ ) von AID verwendet. Wir führten diese Untersuchung an einem Kollektiv von 16 Probanden (5 Hämodialysepatienten sowie 11 immunkompetenten Individuen (5 gesunde Kontrollen, 4 Mitglieder des Klinik-Personals und 2 immungesunde Patienten) zur Detektion einer zellulären Immunität gegen *M. tuberculosis* durch. Als Kontrolle für einen weiteren



**Abb. 12. Vergleich der ELISPOT Assays mit der Durchflusszytometrie.** Beispiel eines Individuums mit Reaktivität gegen *M. tuberculosis*. Dargestellt wurden die Anzahl der ausgezählten Spots auf das jeweilige Antigen im ELISPOT Assay Kit ELSP 5000 IFN $\gamma$  (a) und im T-SPOT.TB (b) sowie entsprechende CD-4-T-Zell-Frequenzen (c) mit Nachweis einer Reaktivität auf alle drei Antigene. Zu beachten ist die unterschiedlich gute Diskriminierbarkeit der Spots (a, b).

Erreger wurde eine Stimulation mit *Cytomegalievirus* (CMV) Antigen durchgeführt.

Sowohl in der Kurzzeitstimulation aus Vollblut als auch in den ELISPOT-Assays (Stimulation von PBMC) wurden die Antigene PPD, ESAT-6 und CFP-10 (zusätzlich eine Negativkontrolle mit Lösungsmittel) sowie CMV-Antigen (zusätzlich eine Negativkontrolle mit Kontroll-Antigen) und SEB zur Positivkontrolle verwendet. Für den Ansatz der ELISPOT-Assays wurden die spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 aus dem jeweiligen Kit verwendet, dabei erfolgte die Stimulation mit Lösungsmittel, PPD, ESAT-6, CFP-10 und CMV-Antigen als Doppelansatz in je zwei Wells.

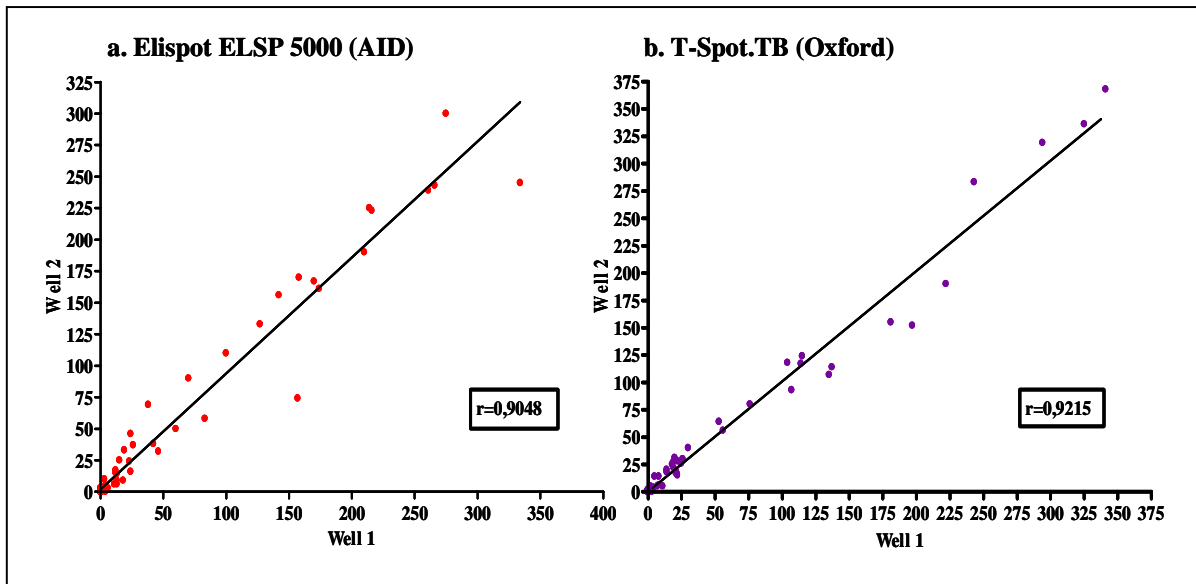
Zur Auswertung der Kurzzeitstimulation bestimmten wir die Frequenzen der reaktiven CD4-T-Zellen gegen das jeweilige Antigen (unter Abzug der Zellfrequenz aus den Kontrollansätzen Lösungsmittel bzw. Kontrollantigen). Nach Durchführung der ELISPOT-Assays wurden die Spots durch ein automatisches Reader-System mit visueller Nachkontrolle ausgezählt. Auch hier wurde die Spotzahl in den Kontrollansätzen von der der spezifischen Stimulation subtrahiert. Ausgehend von den Spots pro Well wurde die Anzahl der reaktiven CD4-T-Zellen (für jedes Antigen) unter Zuhilfenahme der in der Durchflusszytometrie detektierten allgemeinen CD4-T-Zellanzahl sowie des im parallel durchgeführten

Differentialblutbild ermittelten Lymphozytenanteils bestimmt. Hierbei wurde neben der besseren Vergleichbarkeit beider Verfahren der Tatsache Rechnung getragen, dass reaktive Zellen auf spezifische Stimuli vorwiegend unter den CD4-T-Zellen zu finden sind (SESTER et al., 2004).

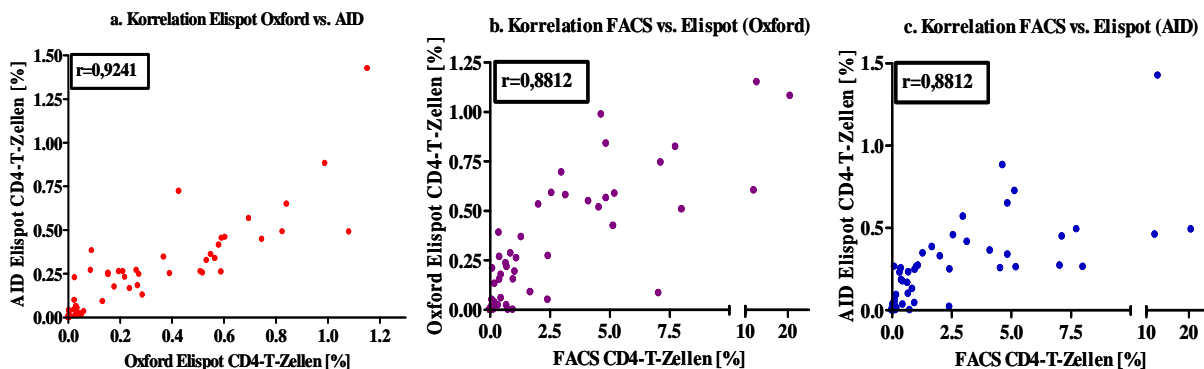
Ein direkter optischer Vergleich der Messergebnisse der ELISPOT Assays mit der Durchflusszytometrie ist am Beispiel eines Hämodialysepatienten mit zellulärer Immunität gegen *M. tuberculosis* in Abbildung 12 dargestellt. Die Stimulation erfolgte mit Lösungsmittel, PPD, ESAT-6 und CFP-10 jeweils im Doppelansatz (je zwei Wells). Dargestellt wurden jeweils die gezählten Spots pro Well und Antigen des ELISPOT Assay Kit ELSP 5000 IFN $\gamma$  (Abb. 12a) und des T-SPOT.TB (Abb. 12b). Die Ermittlung der Spotzahl gestaltete sich insbesondere bei dem ELISPOT Assay Kit ELSP 5000 IFN $\gamma$  aufgrund einer mangelnden Diskriminierung der einzelnen Spots bei hoher Reaktivität schwierig, so dass für alle Wells (beider Systeme) nach Reader-gesteuerter Auszählung eine visuelle Nachkontrolle erfolgte. In der Durchflusszytometrie wurden die Frequenzen reaktiver Zellen gegen die Antigene als Anteil der CD4-T-Zellen angegeben (Abb. 12c). Im Beispiel zeigte sich in keiner Stimulation eine relevante Reaktivität auf das Lösungsmittel, jedoch gegen alle drei Antigene, so dass hier eine zelluläre Immunität gegen *M. tuberculosis* durch alle drei Testsysteme nachgewiesen werden konnte. Dabei galt bei dem ELISPOT Assay Kit ELSP 5000 IFN $\gamma$  ein Stimulationsindex  $\geq 3$  (Spots Antigen/Spots Leerwert) und bei dem T-SPOT.TB eine Differenz  $\geq 6$  Spots (Spots Antigen – Spots Leerwert, bei maximal 5 Spots im Leerwert) als positives Testergebnis.

Um die Validität innerhalb eines ELISPOT-Testsystems zu überprüfen, korrelierten wir die in einem Well gezählten Spots (Lösungsmittel, PPD, ESAT-6, CFP-10 und CMV-Antigen) mit der Spotanzahl in dem jeweils dazugehörigen Well des Doppelansatzes. In dieser „Well-Well-Korrelation“ zeigte sowohl der T-SPOT.TB Assay (Abb. 13b,  $r=0,92$ ,  $p<0,0001$ , CI 0,88–0,95) als auch der ELISPOT Assay Kit ELSP 5000 IFN $\gamma$  (Abb. 13a,  $r=0,90$ ,  $p<0,0001$ , CI 0,85–0,94) eine sehr hohe Übereinstimmung.

Wir verglichen im Folgenden beide ELISPOT-Systeme anhand der aus der Spotanzahl und des Differentialblutbildes ermittelten reaktiven CD4-T-Zell-Frequenzen (Abb. 14a); dabei ergab sich eine hochsignifikante Korrelation (Spearman  $r=0,92$ ,  $p<0,0001$ , CI 0,88–0,95). Bei dem Vergleich der Durchflusszytometrie mit den ELISPOT-Assays bezogen auf die CD4-T-Zell-Frequenzen ergab sich ebenfalls eine hochsignifikante Korrelation (jeweils  $r= 0,8812$ ,  $p<0,0001$ , Abb. 14b und c).



**Abb. 13. T-SPOT.TB gegenüber ELISPOT ELSP 5000 in der Well-Well-Korrelation geringfügig überlegen.** Aufgetragen wurden für ELISPOT Assay Kit ELSP 5000 (a) und T-SPOT.TB (b) die einzelnen Spots aus den Doppelansätzen (Lösungsmittel, PPD, ESAT-6, CFP-10 und CMV-Antigen) in einer Well-Well-Korrelation zur Überprüfung der internen Validität. Dabei zeigte sich für beide Systeme eine signifikante Korrelation mit Spearman  $r = 0,9048$  (a) bzw. Spearman  $r = 0,9215$  (b) mit jeweils  $p < 0,0001$ .



**Abb. 14. Hochsignifikante Korrelation im Vergleich der ELISPOT Assays untereinander und mit der FACS-Analyse.** Dargestellt wurden die CD4-T-Zell-Frequenzen als Mittelwerte (der Doppelansätze) nach Subtraktion der Leerwertkontrolle für die Stimulation mit PPD, ESAT-6, CFP-10, CMV-Antigen und SEB. Hochsignifikante Korrelation zwischen den ELISPOT Systemen (a) mit Spearman  $r = 0,9241$  ( $p < 0,0001$ , CI 0,8824 – 0,9514). Kein Unterschied in der Korrelation des T-SPOT.TB (b) und des ELISPOT Assay Kit ELSP 5000  $\text{INF}\gamma$  (c) jeweils mit der FACS-Analyse. Es ergab sich jeweils Spearman  $r = 0,8812$  ( $p < 0,0001$ ).

Um die qualitativen Ergebnisse zu beurteilen, wurden nach Angaben der Hersteller der ELISPOT-Assays die Stimulationsindices ermittelt und daraus ein positives bzw. negatives Ergebnis für die Reaktivität auf PPD, ESAT-6, CFP-10 und CMV-Antigen abgeleitet. Für die Durchflusszytometrie wurde ein Grenzwert von 0,05% reaktiver CD4-T-Zellen herangezogen. Tabelle 11 zeigt die Vergleiche konkordanter und diskordanter Ergebnisse zwischen den ELISPOT-Systemen und mit der FACS-Analyse. Die ermittelten Daten für die Postitivkontrolle mit SEB gingen nicht ein, da für alle Probanden positive Ergebnisse

vorlagen. Bei der Beurteilung ergab sich als Maß der Übereinstimmung zwischen den ELISPOT-Assays ein Kappa-Koeffizient  $\kappa=0,66$ , im Vergleich der Durchflusszytometrie mit dem ELISPOT ELSP 5000  $\text{INF}\gamma$   $\kappa=0,62$  und eine deutlich bessere Übereinstimmung zwischen T-SPOT.TB und Durchflusszytometrie mit  $\kappa=0,78$ . Hier war auch die Rate an diskordanten Ergebnissen mit knapp 11% am niedrigsten.

Im diagnostischen Spektrum zeigte sich die durchflusszytometrische Detektion reaktiver CD4-T-Zellen den kommerziellen ELISPOT-Assays ebenwüdig, wobei bei Korrelation der quantitativen Ergebnisse sich im Gegensatz zu der qualitativen Beurteilung keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden ELISPOT Assays fanden.

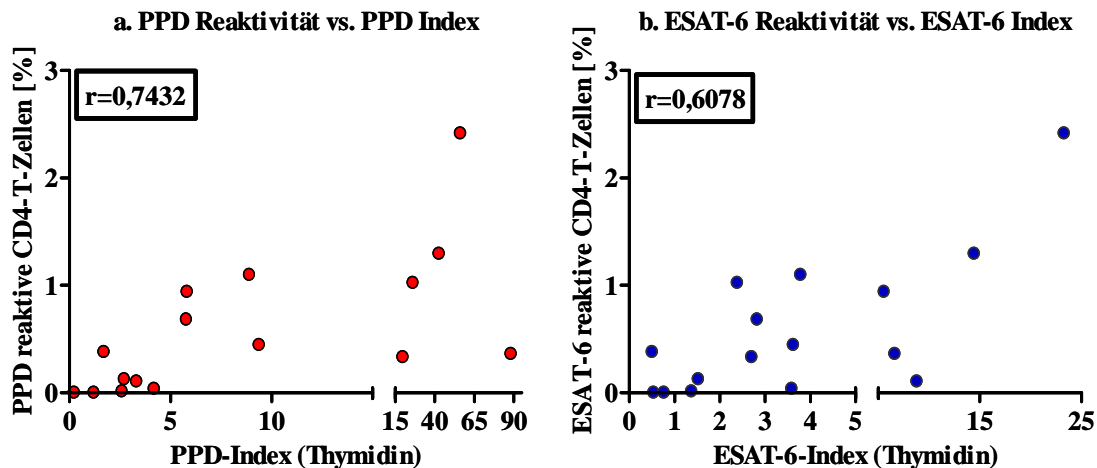
**Tab. 11. Qualitative Analyse.** Berechnung des Kappa-Koeffizienten anhand der positiven und negativen Ergebnisse für 80 Messungen (PPD, ESAT-6 CFP-10 und CMV-Antigen) mittels ELISPOT ELSP 5000 (AID), T-SPOT.TB (Oxford) und der Durchflusszytometrie. Die beste Übereinstimmung ergab sich zwischen T-SPOT.TB und der Durchflusszytometrie mit Kappa=0,78.

		Durchflusszytometrie			ELSP 5000 $\text{INF}\gamma$ (AID)		
		< 0,05 %	$\geq 0,05$ %	Gesamt	negativ	positiv	Gesamt
<b>ELSP 5000 <math>\text{INF}\gamma</math> (AID)</b>	negativ	21	6	27			
	positiv	6	31	37			
	Gesamt	27	37	64			
	Kappa	$\kappa=0,62$					
<b>T- SPOT.TB (Oxford)</b>	negativ	27	7	34	25	9	34
	positiv	0	30	30	2	28	30
	Gesamt	27	37	64	27	37	64
	Kappa	$\kappa=0,78$			$\kappa=0,66$		

#### **4.2.6 Befähigung der auf PPD und ESAT-6 reaktiven Zellen zur Zellteilung im Thymidin-Proliferationsassay**

Zur Ergänzung der durchflusszytometrischen Charakterisierung reaktiver Zellen wurde analysiert, inwieweit diese Zellen nach Aktivierung durch spezifische Antigene zur Zellteilung befähigt seien. Dazu wurde ein Proliferationsassay mit  $^3\text{H}$ -Thymidin durchgeführt, welches nach spezifischer Aktivierung - eine zuvorige Sensibilisierung vorausgesetzt - bei Zellteilung in neusynthetisierte DNA eingebaut wird.

Bei den in 4.2.5 eingeschlossenen 16 Probanden wurde ein Thymidin-Proliferationsassay mit aus Vollblut separierten PBMC durchgeführt. Dabei erfolgte die Stimulation als Dreifachansatz je mit Lösungsmittel, PPD, ESAT-6, CMV-Kontroll-Antigen, CMV-Antigen



**Abb. 15. Signifikante Korrelation zwischen der Reaktivität und der Proliferation auf spezifisches Antigen.** Dargestellt wurde die Korrelation zwischen den aus den Mittelwerten errechneten  $^3\text{H}$ -Thymidin-Stimulationsindices und der Frequenzen reaktiver CD4-T-Zellen jeweils auf das gleiche Antigen bezogen. Es zeigte sich jeweils eine signifikante Korrelation mit Spearman  $r=0,7432$  ( $p=0,001$ ) für PPD (a) und Spearman  $r=0,6078$  ( $p=0,0125$ ) für ESAT-6 (b).

und SEB. Wir maßen den durch das  $^3\text{H}$ -Thymidin vermittelten radioaktiven  $\beta$ -Zerfall mit einem Szintillationszähler als counts/min. Auf welche Antigene die Zellen reagierten, war durch die parallel durchgeführte Kurzzeitstimulation bekannt. Für jedes Antigen wurde ein Thymidin-Stimulationsindex aus dem Mittelwert des Dreifachansatzes (counts/min) durch die gemittelte Messung des Kontrollansatzes berechnet. Unter den Indices über alle Antigene ergab sich ein Median mit 4,01 bei breiter Streuung von einem Minimum von 0,24 bis Maximum von 88,19. Dabei lag unter den 15 durchflusszytometrischen Messungen, bei der kein relevanter Anteil an reaktiven CD4-T-Zellen detektiert werden konnte ( $<0,05\%$ ), das Maximum der korrelierenden Stimulationsindices nur bei 4,19. In der antigenbezogenen Korrelation der Stimulationsindices mit den entsprechenden Frequenzen reaktiver CD4-T-Zellen (für alle verwendeten Antigene) ergab sich eine hochsignifikante Korrelation (Spearman  $r=0,70$ ,  $p<0,0001$ , CI 0.52-0.81; graphisch nicht dargestellt). Exemplarisch sind die Korrelationen für die *M. tuberculosis* relevanten Antigene PPD (Abb. 15a) und ESAT-6 (Abb. 15b) dargestellt, wobei die Korrelation für PPD stärker ausgeprägt war als die für ESAT-6 (Spearman  $r=0,74$ ,  $p=0,001$  versus  $r=0,61$ ,  $p=0,0125$ ).

Wir berechneten zusätzlich als Maß der Übereinstimmung die Kappa-Koeffizienten und ermittelten den Anteil der konkordanten und diskordanten qualitativen Ergebnisse. Dabei wurde ein Stimulationsindex  $\geq 3$  und eine Frequenz reaktiver CD4-T-Zellen  $\geq 0,05\%$  jeweils als positives Ergebnis gewertet. Für die Verwendung des PPD ergab sich eine deutlich höhere Übereinstimmung mit einem Kappakoeffizient  $\kappa=0,54$  im Vergleich zu ESAT-6 mit  $\kappa=0,38$ .

Der Anteil diskordanter Ergebnisse war für PPD mit 18,7% niedriger als bei ESAT-6 mit 31,2%. Bei letzterem zeigte sich insbesondere bei vier Individuen eine Reaktivität gegen ESAT-6 in der Durchflusszytometrie ohne Nachweis von Zellproliferation.

Zusammenfassend konnte in Kapitel 4.2 der Nutzen und die sinnvolle Benutzung der *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 zur Abgrenzung einer BCG-Immunsierung aufgezeigt werden. Die Antigene ergänzen sinnvoll das Tuberkulin in vitro beim Immungesunden und -kompromittierten und erzielen in Kombination eine erhöhte diagnostische Empfindlichkeit und Spezifität im Vergleich zum Hauttest. Die Detektion mittels Durchflusszytometrie kann auch mit kommerziellen ELISPOT-Systemen konkurrieren, erlaubt zudem die Phänotypisierung der reaktiven Zellen. Diese scheinen wie im letzten Abschnitt im Rahmen des Thymidin-Proliferationsassays gezeigt, insbesondere nach Stimulation mit PPD zur Zellteilung befähigt zu sein.

### **4.3 Diagnostik der latenten Tuberkulose-Infektion bei immunkompromittierten Patienten mit rheumatischen Erkrankungen**

Bei Patienten mit Hämodialyse oder nach Nierentransplantation konnten wir in der Vergangenheit auch dann noch eine zelluläre Immunität gegen *M. tuberculosis* durchflusszytometrisch nachweisen, wenn der Hauttest bei abgeschwächter Immunitätslage ein falsch negatives Ergebnis erbracht hatte (SESTER et al., 2004; SESTER et al., 2006). Im Rahmen der Evaluation unserer Kurzzeitstimulation schlossen wir ein weiteres Kollektiv von immunkompromittierten Patienten in unsere Untersuchungen ein, um die Güte des Tests bei bestehender Immundefizienz zu untermauern. Es handelte sich in dem Fall um Patienten mit im Vorfeld diagnostizierten rheumatischen Erkrankungen (Tab. 12). Bei diesen sollte vor einem Beginn mit einer medikamentösen TNF $\alpha$ -Blockade eine latente Tuberkulose-Infektion aufgrund der Gefahr einer Reaktivierung ausgeschlossen werden.

#### **4.3.1 Patientencharakterisierung und Diagnostik der latenten Tuberkulose durch Standard-Verfahren sowie durch Nachweis reaktiver Zellen**

Im Rahmen unserer Untersuchung in Kooperation mit der rheumatischen Abteilung der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim wurden 97 Patienten mit bekannter rheumatischer Erkrankung zum Zweck der Therapieoptimierung sowie Prüfung der Indikation für eine Behandlung mit TNF $\alpha$ -Antagonisten einbestellt. Es schloss sich die Diagnostik einer latenten Tuberkulose-Infektion und ggf. Einleiten einer medikamentösen INH-Prophylaxe bei positiver Indikation für eine Therapie mit „Biologicals“ an. Die Patienten wurden nach einer



BCG-Impfung oder einer Tuberkulose-Infektion in der Vergangenheit befragt. Bei positiven Angaben hinsichtlich einer Infektion wurden weitere Informationen durch den Hausarzt oder der behandelnden Klinik zur Verifizierung eingeholt. Eine röntgenologische Untersuchung des Thorax ergänzte das standardisierte Verfahren mittels Hauttest nach Mendel-Mantoux. Für diesen injizierten wir 5 IU Tuberkulin intrakutan und maßen die maximale Induration nach 48 bis 72 Stunden aus. Parallel detektierten wir durchflusszytometrisch reaktive CD4-T-Zellen gegen PPD, ESAT-6 und CFP-10 (zusätzlich Ansatz mit Lösungsmittel) aus heparinisiertem Vollblut.

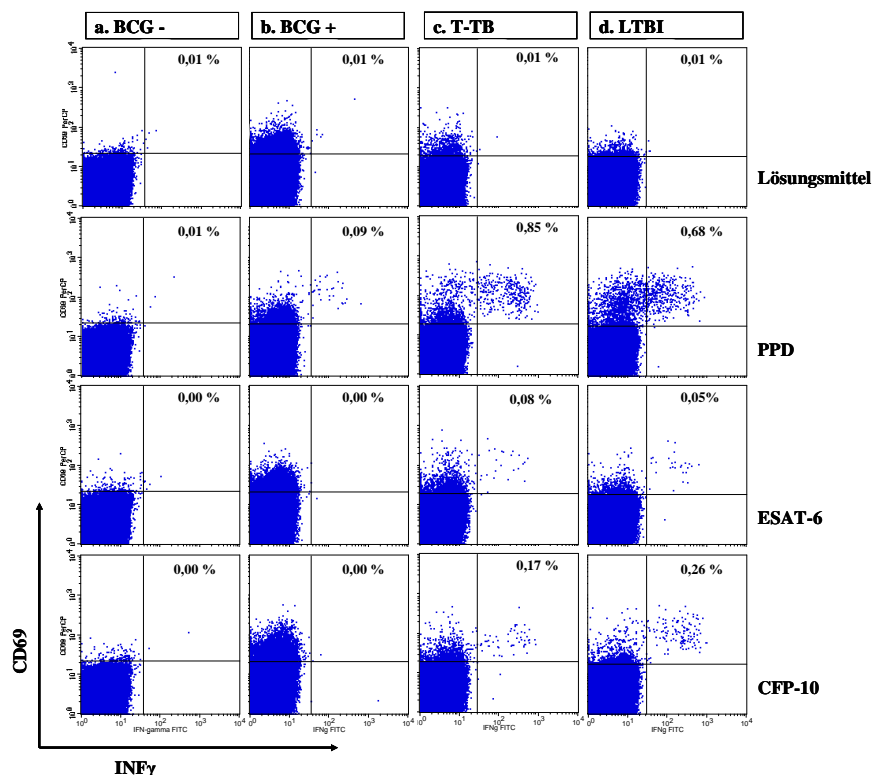
Die demografischen Daten der Patienten mit Grunderkrankung und verabreichter immunsuppressiver Medikation sind in Tabelle 12 dargestellt. Die Mehrheit litt an einer Rheumatoiden Arthritis (n=48), desweiteren waren Patienten mit ankylosierender Spondylitis (n=23) und Psoriasis-Arthritis (n=18) miteingeschlossen. Bei einer kleinen Gruppe von Patienten (n=8), welche unter „sonstigen rheumatischen Erkrankungen“ zusammengefasst wurden, waren vier Fälle von undifferenzierter Spondylarthropathie sowie je einem Fall einer enteropathischen Spondylitis, juveniler Arthritis, Dermatomyositis sowie eines Sharp-Syndroms diagnostiziert. Erfasst wurden auch die Anzahl der „disease modifying antirheumatic drugs“ (DMARD) und die mittlere Dosis an Kortikosteroiden.

**Tab. 12. Patientencharakteristik:** Diagnose, Alter, Geschlecht, Erkrankungsdauer und Medikation.

Diagnose	n	Alter [Jahre] [m±SD]	Geschlecht, ♀/♂ [%]	Dauer der Erkrankung [Jahre] [m±SD]	Anzahl der DMARD's [m±SD]	Prednisolon Dosis [mg] [m±SD]
Summe	97	54 ± 13	59/41	7 ± 9	1,4 ± 1,4	8 ± 10
Rheumatoide Arthritis	48	60 ± 10	73/27	9 ± 9	2,2 ± 1,4	13 ± 10
Ankylosierende Spondylitis	23	46 ± 12	35/65	7 ± 9	0,2 ± 0,5	1 ± 4
Psoriasis Arthritis	18	54 ± 12	61/39	2 ± 3	0,7 ± 0,8	3 ± 5
Andere	8	45 ± 19	38/62	7 ± 14	1,5 ± 1,5	16 ± 16

Ähnlich wie bei Immungesunden fanden sich auch bei Patienten mit rheumatoider Arthritis charakteristische Reaktivitätsmuster in der durchgeführten FACS-Analyse: Drei repräsentative Beispiele für je ein Individuum ohne und mit BCG-Impfung sowie einer

Tuberkulose-Infektion in der Vergangenheit und einer latenten Infektion sind in Abbildung 15 dargestellt. Dabei konnte in keiner der Analysen eine relevante Aktivität ( $<0,05\%$ ) auf das Lösungsmittel festgestellt werden. Bei der nichtgeimpften Person (Abb. 15a) konnte keine Reaktivität detektiert werden. Bei der Person mit der BCG-Impfung (Abb. 15b) konnten 0,09% reaktive CD4-T-Zellen nur gegen PPD nachgewiesen werden. Sowohl bei der alten behandelten Infektion (Abb. 15c) als auch der latenten Infektion (Abb. 15d) zeigte sich eine deutliche Reaktivität gegen die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10, wobei sich die beiden Stadien nicht anhand der Reaktivität unterscheiden ließen.



**Abb. 15. Zelluläre Immunität gegen *Mycobacterium tuberculosis* bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen ist durchflusszytometrisch nachweisbar.** Als repräsentatives Beispiel für die FACS-Analyse unter den 97 Patienten mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises wurden die Dotplots von vier Individuen dargestellt. Die Stimulation wurde bei allen mit Lösungsmittel, PPD, ESAT-6 und CFP-10 durchgeführt. Kein Nachweis von reaktiven Zellen ( $<0,05\%$ ) lag bei fehlender zellulärer Immunität (a) und Reaktivität alleine gegen PPD bei stattgehabter BCG-Immunisierung (b) vor. Bei anamnestisch bekannter alter und erfolgreich behandelte Tuberkulose-Infektion (c) ließen sich wie auch bei der latent infizierten Person (d) zusätzlich auch reaktive Zellen gegen ESAT-6 und CFP-10 nachweisen.

Die Ergebnisse dieser in-vitro-Stimulation wurden mit den ausgemessenen Indurationen des Hauttestes verglichen. Hier korrelierten die Indurationen [mm] mit den Frequenzen der PPD reaktiven CD4-T-Zellen [%] signifikant (Spearman  $r=0,48$ ,  $p<0,0001$ , graphisch nicht dargestellt), wobei der Korrelationskoeffizient geringer war als bei immunkompetenten Individuen ( $r=0,58$ , Abschnitt 4.1.1, Abb. 4). Somit ist aufgrund der Immundefizienz von

einem größeren Anteil an falsch negativen Hauttest-Ergebnissen auszugehen. Insgesamt zeigten 86,6% (84/97) Patienten mit rheumatischen Erkrankungen einen negativen Hauttest-Befund. Bei den unter 4.1.1 untersuchten immunkompetenten Individuen lag der Anteil nur bei 60,5% (314/519). Bei der Prüfung der diskordanten Ergebnisse bezüglich Reaktivität auf PPD in vitro und in vivo konnte für diejenigen mit negativem Hauttest und positiver PPD-Reaktivität ein Anteil von 27,8% (27/97), im umgekehrten Fall von jedoch nur 1% (1/97) ermittelt werden. Demzufolge zeigten die qualitativen Ergebnisse lediglich eine schwache Übereinstimmung ( $\kappa=0,33$ ).

Die Zusammenstellung der Einzelergebnisse durch die verschiedenen Untersuchungen zur Diagnosestellung einer latenten Tuberkulose-Infektion ist in Tabelle 13 dargestellt: Anhand der Anamneseerhebung und Prüfung der medizinischen Unterlagen konnten vier Patienten mit einer Tuberkulose-Erkrankung in der Vergangenheit ermittelt werden, drei davon aus dem Kollektiv der Patienten mit rheumatoider Arthritis. Eine BCG-Immunisierung in der Kindheit war nur bei fünf Patienten nachvollziehbar. Bei der Durchführung des Hauttestes zeigten 13 Patienten eine positive Reaktion (Induration mindestens 5 mm), bei 69 Patienten war keine Hautreaktion zu finden. Die restlichen Patienten zeigten eine Induration zwischen 1 und 4 mm, dieses Ergebnis wurde entsprechend der Richtlinien als negativ gewertet. Bei den vier Individuen mit bekannter Tuberkulose in der Vergangenheit zeigten nur zwei eine positive Hauttest-Reaktion, bei den beiden anderen entwickelte sich keine Induration. Drei dieser vier Patienten zeigten jedoch in der FACS-Analyse Reaktivität auf ESAT-6 und CFP-10, einer von den beiden mit negativem Hauttest wies jedoch auch hier keine Reaktivität auf. Unter den geimpften Patienten lag nur ein positives Hauttest-Ergebnis vor. Ein Patient ohne positive Anamnese bezüglich Tuberkulose-Infektion oder BCG-Impfung mit normalem computertomographischem Thorax-Befund entwickelte eine über 2 cm im Durchmesser messende Hautnekrose.

Die Tuberklin-Reaktivitäten in vivo und in vitro vergleichend konnten mit dem Hauttest 13 Patienten und in der Kurzzeitstimulation mit PPD 39 Patienten positiv getestet werden. Dies weist auf eine höhere Empfindlichkeit des Vollblut-Assays hin, obgleich bei Verwendung von PPD als Stimulus keine Unterscheidung eines stattgehabten Kontaktes mit *M. tuberculosis* von einer zellulären Immunität gegen BCG möglich ist. Von den 39 Patienten mit PPD-spezifischer Reaktivität zeigten 14 auch reaktive CD4-T-Zellen gegen ESAT-6 und/oder CFP-10, so dass hier eine reine BCG Impfantwort ausgeschlossen werden konnte.

In der Gruppe der Patienten mit rheumatoider Arthritis und Psoriasis Arthritis, zeigten etwa

10% eine positive Hautreaktion und 20% Reaktivität gegen ESAT-6 und/oder CFP-10. Interessanterweise wies nur ein Patient in der Gruppe mit ankylosierender Spondylitis eine signifikante Reaktivität gegen ESAT-6 auf, wohingegen der Anteil der Patienten mit positivem Hauttest in dieser Gruppe am höchsten war.

**Tab. 13. Diagnostische Hinweise auf eine latente Tuberkuloseinfektion.** Getrennt aufgetragen nach Diagnose wurden Hinweise in der Anamnese auf erinnerte oder dokumentierte Tuberkulose-Erkrankung oder BCG-Impfung. Standard-Diagnostik mittels Röntgen Throax und Tuberkulin Hauttest. Durchflusszytometrisch detektierte Reaktivität auf PPD, ESAT-6 und CFP-10.

Diagnose	n	Anamnestisch:			Positive Testung:				
		Tbc Erkrankung	BCG Impfung	Suspekte Röntgen Befunde	Hauttest	PPD	ESAT-6 u./o. CFP-10	ESAT-6	CFP-10
Rheumatoide Arthritis	48	3	2	5	5	20	10	6	9
Ankylosierende Spondylitis	23	0	3	1	5	10	1	1	0
Psoriasis Arthritis	18	1	0	1	3	8	5	4	5
Andere	8	0	0	0	0	1	0	0	0
Summe	97	4	5	7	13	39	16	11	14

Keinerlei positive Reaktionen waren bei vier beobachteten Patienten unter 31 Jahren nachzuweisen. Im weiteren Altersvergleich konnten sowohl bei den mittelalten Patienten (31 bis 64 Jahre) als auch den älteren Patienten (älter als 64 Jahre) ein ähnlich hohes Auftreten positiver Hauttestergebnisse mit 14 % (10/73 Patienten) vs. 15 % (3/20 Patienten) beobachtet werden. Jedoch ließ sich in der Durchflusszytometrie bei den – alle nicht-geimpften - älteren Patienten ein höherer Anteil reaktiver CD4-T-Zellen sowohl gegen PPD mit 55% (11/20) als auch ESAT-6 bzw. CFP-10 mit 20,25% (5/20) im Vergleich zur mittelalten Bevölkerung mit 38% (28/73) gegen PPD und 15% (11/73) gegen die spezifischen Antigene detektieren. Dieses Ergebnis ist mit der zunehmenden Wahrscheinlichkeit einer Exposition gegen *M. tuberculosis* im Laufe des Lebens in Einklang zu bringen.

Bei 7 Patienten konnten in der röntgenologischen Untersuchung des Thorax suspekte Befunde wie Kavernen, Lymphknotenverkalkungen oder multiple Knötchen in den Lungenoberlappen als spezifische Hinweise auf eine Tuberkulose-Infektion gefunden werden. Zwei dieser Patienten zeigten ein positives Ergebnis im Hauttest und der Durchflusszytometrie, die

restlichen in beiden Verfahren nicht. Bei einem Patienten konnte eine aktive Tuberkulose durch positive Kultur von *M. tuberculosis* in der Bronchiallavage diagnostiziert werden.

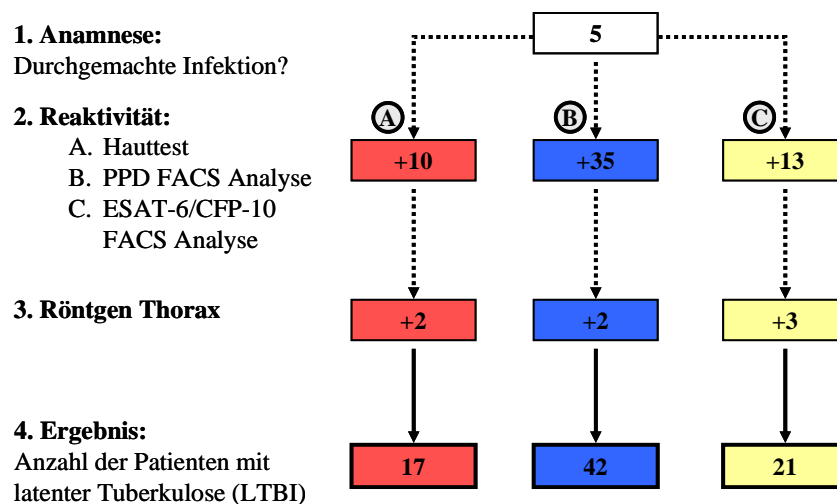
#### 4.3.2 Bewertung der Ergebnisse mit Entscheidungsfindung anhand eines Algorithmus zur Diagnosestellung und Behandlung einer latenten Tuberkuloseinfektion

Wir führten zur besseren Vergleichbarkeit eine Analyse der internen Konkordanz der verschiedenen verwendeten Tests durch (Tab. 14): Von allen 13 Patienten, welche eine positive Reaktion im PPD Hauttest zeigten, wiesen dies auch 12 Patienten in der FACS-Analyse mit PPD (92%) auf. Die Induration im Hauttest zeigte eine signifikante Korrelation mit PPD-reaktiven T-Zell-Frequenzen (Spearman  $r=0,48$ ,  $p<0.0001$ ). Nur ein Drittel (31%) der Patienten mit Reaktivität gegen PPD im Vollblut-Assay reagierte hingegen auch im Hauttest. Bei den Patienten mit nachweisbaren CD4-T-Zellen gegen PPD im Vollblut-Assay zeigten 36% eine Reaktivität gegenüber ESAT-6 bzw. CFP-10 und stellten somit die Gruppe der mutmaßlich latent infizierten Personen dar. Bei allen Patienten mit ESAT-6/CFP-10 Reaktivität konnte bis auf zwei auch eine Reaktivität gegen PPD detektiert werden. Bei nur 6 von 13 Patienten mit positivem Hauttest fand sich jedoch auch eine Reaktivität gegen die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und/oder CFP-10. Es waren dabei keine offensichtlichen Unterschiede in der Höhe der verabreichten Steroide oder der Anzahl der aktuellen oder früher verabreichten DMARD oder hinsichtlich der Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus oder einer Niereninsuffizienz zu erkennen.

**Tab. 14. Interne Konkordanz.** Vergleich positiver Testergebnisse (linke Spalte) mit konkurrierenden Testverfahren (Reihe oben): PPD Hauttest versus in-vitro Reaktivität auf PPD bzw. ESAT-6/CFP-10.

Konkordanz Positives Ergebnis im Vergleich mit	PPD Hauttest	reaktive CD4-T-Zellen in FACS-Analyse	
	n=13	PPD n=39	ESAT-6/CFP-10 n=16
PPD Hauttest		12/39 (31 %)	6/16 (38 %)
reaktive CD4-T-Zellen gegen PPD	12/13 (92 %)		14/16 (88 %)
reaktive CD4-T-Zellen gegen ESAT-6/CFP-10	6/13 (46 %)	14/39 (36 %)	

Um im klinischen Alltag bei einem derartigen Patientenkollektiv die Diagnose der latenten Tuberkulose stellen zu können, entwickelten wir einen Entscheidungsbaum mit verschiedenen



**Abb. 16. Entscheidungsbaum zur Klassifikation einer latenten Tuberkulose Infektion.** Dargestellt wurde ein viergliedriger Entscheidungspfad zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Screeningkombinationen zur Diagnostik der LTBI. In Schritt 1 wurden alle Patienten mit stattgehabter oder aktiver Tuberkulose eingeschlossen. In Schritt 2 wurde jeweils ein Verfahren bestimmt, durch welches weitere Patienten als latent infiziert detektiert werden konnten. In Pfad A wurde eine Induration  $\geq 5$ mm im Hauttest verwendet, in Pfad B reaktive CD4-T-Zellen gegen PPD und in Pfad C gegen ESAT-6 und/oder CFP-10. Bisher noch nicht erfasste Patienten mit auffälligem Röntgen Thorax Befund wurden in Schritt 3 eingeschlossen. In Schritt 4 wurde die Gesamtanzahl der durch die entsprechenden Testverfahren als latent infiziert diagnostizierten Patienten aufgetragen. Pfad A unter Verwendung des Hauttests erwies sich mit 17 Fällen als am wenigsten empfindlich. Unter Verwendung von reaktiven CD4-T-Zellen (Pfad B und C) ließen sich weit mehr Fälle detektieren, wobei die alleinige Verwendung von PPD (Pfad B) eine niedrigere Spezifität aufwies und vermutlich einen erheblichen Anteil an falsch positiven Ergebnissen lieferte im Vergleich zur Verwendung der *M. tuberculosis* spezifischen Antigene (Pfad C).

Diagnosepfaden (Abb. 16). Basierend auf den klinischen und experimentellen Ergebnissen wurde evaluiert, wie viele Patienten unter Standardbedingungen (Pfad A, Hauttest) bzw. unter Zuhilfenahme der PPD-Reaktivität in vitro (Pfad B) oder ESAT-6/CFP-10 Reaktivität (Pfad C) als latent mit *M. tuberculosis* infiziert zu diagnostizieren seien.

Fünf Patienten wurden aufgrund ihrer positiven Anamnese bzw. des Nachweises einer aktiven Infektion bei einer Person als positiv eingestuft (Abb. 16, Schritt 1). Bei Pfad A wurden weitere 10 Patienten mit positivem Hauttest-Ergebnis eingeschlossen, bei Pfad B 35 zusätzliche Patienten mit positiver PPD-Reaktivität in der Durchflusszytometrie und bei Pfad C 13 Patienten mit reaktiven CD4-T-Zellen gegen ESAT-6 bzw. CFP-10 (Schritt 2). In einem dritten Schritt wurden schließlich alle zuvor nicht erfassten Patienten mit suspektem Röntgenbefund hinzugezählt (Abb. 16, Schritt 3). Bei Vergleich der drei Pfade konnten durch Pfad A (Hauttest) im Vergleich zu Pfad C (Reaktivität gegen ESAT-6 bzw. CFP-10) 17 gegenüber 21 Patienten als latent infiziert angenommen werden. Unter diesen Patienten waren nur 12 durch beide Algorithmen erfasst, während fünf bzw. neun Patienten ausschließlich durch einen der beiden Pfade nachgewiesen werden konnten. Man könnte spekulieren, dass

die neun Patienten aus Pfad C mit einer tatsächlichen latenten Tuberkulose-Infektion aufgrund der erhöhten Empfindlichkeit des in-vitro-Verfahrens detektiert wurden. Bei Screening auf Grundlage der alleinigen Verwendung einer PPD-Reaktivität in der Durchflusszytometrie (Abb. 16, Pfad B) wären signifikant mehr Patienten aufgrund der erhöhten Empfindlichkeit (im Vergleich mit der PPD-Reaktivität des Hauttests) detektiert worden, allerdings auf Kosten einer niedrigeren Spezifität im Vergleich zu dem ESAT-6/CFP-10 Screening.

Nach Abschluss der Bewertung wurden etwa 60% aller getesteten Patienten mit einem TNF $\alpha$ -Blocker behandelt, unter ihnen erhielten 15% Infliximab, 34% Etanercept und die restlichen Adalimumab. Die wichtigsten Gründe für die Nichtverabreichung waren das Nichtvorliegen einer medizinischen Indikation bei 21 Patienten. Bei fünf Patienten wurde aufgrund von Komorbiditäten auf die TNF $\alpha$ -Blocker verzichtet, darunter eine Person mit der Diagnose eines Malignoms. Drei Patienten mit Indikation wählten eine alternative Therapie. Bei fünf Patienten mit latenter Tuberkulose-Infektion erschienen die Risiken für eine zuvor durchzuführende INH-Prophylaxe als zu schwerwiegend im Vergleich zu einer Alternativtherapie.

Die Entscheidung zur INH-Prophylaxe vor Behandlung mit TNF $\alpha$ -Blockern wurde basierend auf den aktuell geltenden Richtlinien anhand des Pfades A getroffen. Neun Patienten wurden prophylaktisch mit INH behandelt. Dabei ist zu beachten, dass unter diesen neun Patienten unter Verwendung der Reaktivität gegen ESAT-6 bzw. CFP-10 anstatt des Hauttests (Pfad C) bei vieren keine INH-Prophylaxe durchgeführt worden wäre. Auf der anderen Seite hätten unter diesen Bedingungen sechs der 52 nicht behandelten Patienten eine INH-Prophylaxe erhalten. Diese Patienten wären unter Berücksichtigung des Hauttestes (Pfad A) als falsch negativ anzusehen. Bei den fünf Patienten, bei denen aufgrund der LTBI keine Behandlung mit TNF $\alpha$ -Blockern durchgeführt wurde, unterschieden sich die qualitativen Ergebnisse des Hauttests und der durchflusszytometrischen Reaktivität auf ESAT-6 bzw. CFP-10 nicht.

Zusammenfassend konnte der Einsatz der Durchflusszytometrie zum Nachweis *M. tuberculosis* spezifischer CD4-T-Zellen die Routine-Verfahren zur Diagnostik einer latenten Tuberkulose bei dem Patientenkollektiv mit rheumatischen Erkrankungen und begleitender immunsuppressiver Medikation sinnvoll ergänzen. Eine Kombination der *M. tuberculosis* spezifischen Antigene und der damit erhöhten Spezifität mit der in-vitro-Stimulation mit PPD und der damit verbundenen erhöhten Sensitivität erschien zur Diagnosefindung zweckmäßig.

#### 4.4 Unterscheidungsmerkmale zwischen einer abgelaufenen und einer immunologisch frischen Tuberkulose-Infektion

Durch die Verwendung von PPD und den *M. tuberculosis* spezifischen Antigenen ESAT-6 und CFP-10 war es möglich, eine zelluläre Immunität in immunkompetenten und immunkompromittierten Individuen durchflusszytometrisch nachzuweisen. Da eine Unterscheidung zwischen aktiver Erkrankung und erfolgreich behandelte Tuberkulose oder latenter Infektion bisher nicht möglich war, versuchten wir Unterscheidungskriterien in unserem durchflusszytometrischen Assay zu erarbeiten: Wir führten bei 24 Patienten mit unbehandelter aktiver Tuberkulose (A-TB) und bei 28 Patienten mit erfolgreich behandelte Tuberkulose-Infektion (T-TB) eine Kurzzeitstimulation aus heparinisiertem Vollblut unter Verwendung der Antigene PPD, ESAT-6 und CFP-10 durch. Neben dem Nachweis reaktiver Zellen durch die Detektion von IFN $\gamma$  und CD69, wurden die Zellen zusätzlich auf Expression des Zytokins IL-2 untersucht. Demographische und klinische Charakteristika der rekrutierten Patienten sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Die aktiven Tuberkulose-Infektionen wurden in 12 Fällen durch Kultur von *M. tuberculosis*, in 9 Fällen durch mikroskopische Identifizierung säurefester Stäbchen und in 3 Fällen durch klinische Verbesserung unter antituberkulöser Therapie nachgewiesen.

Tab. 14. Charakterisierung der Patientengruppen A-TB und T-TB.

	Aktive Erkrankung, n=24	Behandelte Tuberkulose, n=28
<b>Demographische Charakteristika</b>		
Alter [Jahre]	46,7 $\pm$ 18,7	58,7 $\pm$ 14,2
Geschlecht [♀/♂]	15/9	7/21
<b>Ethnizität</b>		
weiß	19	28
asiatisch	4	0
indisch	1	0
<b>Organmanifestation der Tuberkulose</b>		
Lunge	19	
Lymphknoten	1	
Niere	1	
Haut	1	
Disseminiert	2	



#### 4.4.1 Frequenzen PPD reaktiver CD4-T-Zellen liegen signifikant höher bei der aktiven Tuberkulose-Infektion

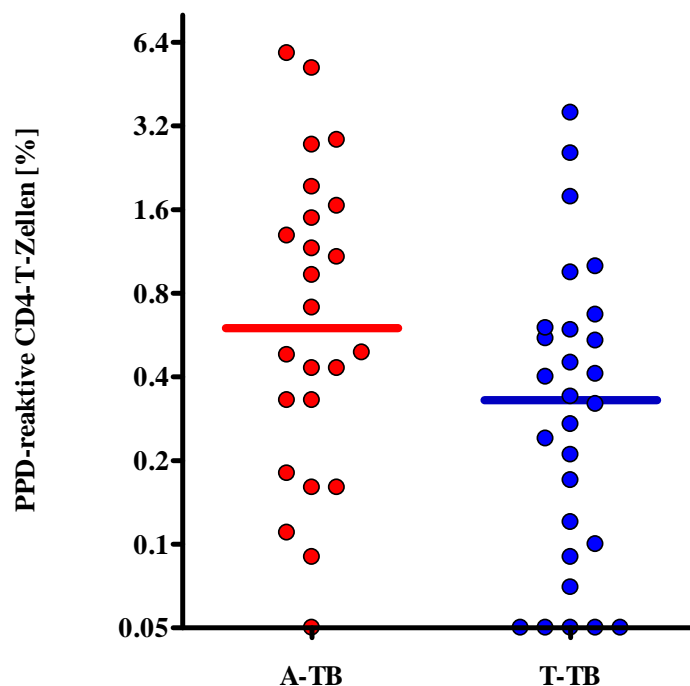
Nach Durchführung der Kurzzeitstimulation wurde eine Quantifizierung reaktiver CD4-T-Zellen über die Expression von IFN $\gamma$  und CD69 vorgenommen. Mit Ausnahme eines Patienten, der seit 19 Monaten unter Therapie mit Kortikosteroiden stand, konnten bei allen reaktive CD4-T-Zellen gegen PPD detektiert werden (95,8%). Demgegenüber zeigten nur 16 der 24 Patienten (66,7%) eine Reaktivität gegenüber der *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10. Unter den 28 Personen mit erfolgreich behandelter Tuberkulose reagierten nur 23 (82,1%) auf PPD und nur 16 (57,1%) waren positiv auf ESAT-6 und/oder CFP-10 getestet (Tab. 15).

**Tab. 15. Nachweis einer zellulären Immunität mittels Durchflusszytometrie bei aktiver und stattgehabter Tuberkulose-Infektion.** Tabellarisch wurden positive Testergebnisse (reaktive CD4-T-Zellen jeweils  $\geq 0,05\%$ ) anteilig an den bekannten aktiven oder stattgehabten Tuberkulose-Infektionen aufgetragen. So lag bei den Fällen mit aktiver Tuberkulose der Anteil an reaktiven CD4-T-Zellen gegen PPD bei 95,8%, bei den behandelten Infektionen konnten nur 82,1% PPD-reaktive CD4-T-Zellen nachgewiesen werden. Die Reaktivität gegen die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene fand sich bei 2/3 der Patienten mit aktiver Tuberkulose und nur noch bei 57,1% unter den behandelten Infektionen.

Reaktive CD4-T-Zellen gegen	Aktive Tuberkulose, n=24	Behandelte Tuberkulose, n=28
PPD	23 (95,8%)	23 (82,1%)
ESAT-6/CFP-10	16 (66,7%)	16 (57,1%)

Wenngleich die Frequenzen PPD-reaktiver CD4-T-Zellen bei Patienten mit aktiver Tuberkulose höher lagen (Median 0,71%; IQR 1,32%) als bei denen mit stattgehabter Infektion (Median 0,33%, IQR 0,50%;  $p=0,029$ , Mann-Whitney-Test, Abb. 17), war basierend auf der mittels IFN $\gamma$  ermittelten Frequenzen PPD-reaktiver CD4-T-Zellen aufgrund der großen Streubreite keine klare Unterscheidung zwischen beiden Gruppen möglich. Somit sind weder die Frequenzen PPD-reaktiver T-Zellen noch die Reaktivität gegenüber ESAT-6 oder CFP-10 als Entscheidungskriterien zur Unterscheidung zwischen aktiver und erfolgreich behandelter Tuberkulose geeignet.

Bei Patienten mit erfolgreich behandelter Tuberkulose korrelierten wir den bekannten Zeitabstand (mittlerer Abstand  $35,5 \pm 20,4$  Jahre) zwischen der therapeutischen Behandlung und dem Messzeitpunkt mit der Frequenz PPD reaktiver Zellen. Hier ließ sich jedoch kein signifikantes Ergebnis erheben, welches auf den zeitlichen Abstand einer behandelten Tuberkulose-Infektion anhand der Höhe der PPD-Frequenz schließen ließe (nicht gezeigt).



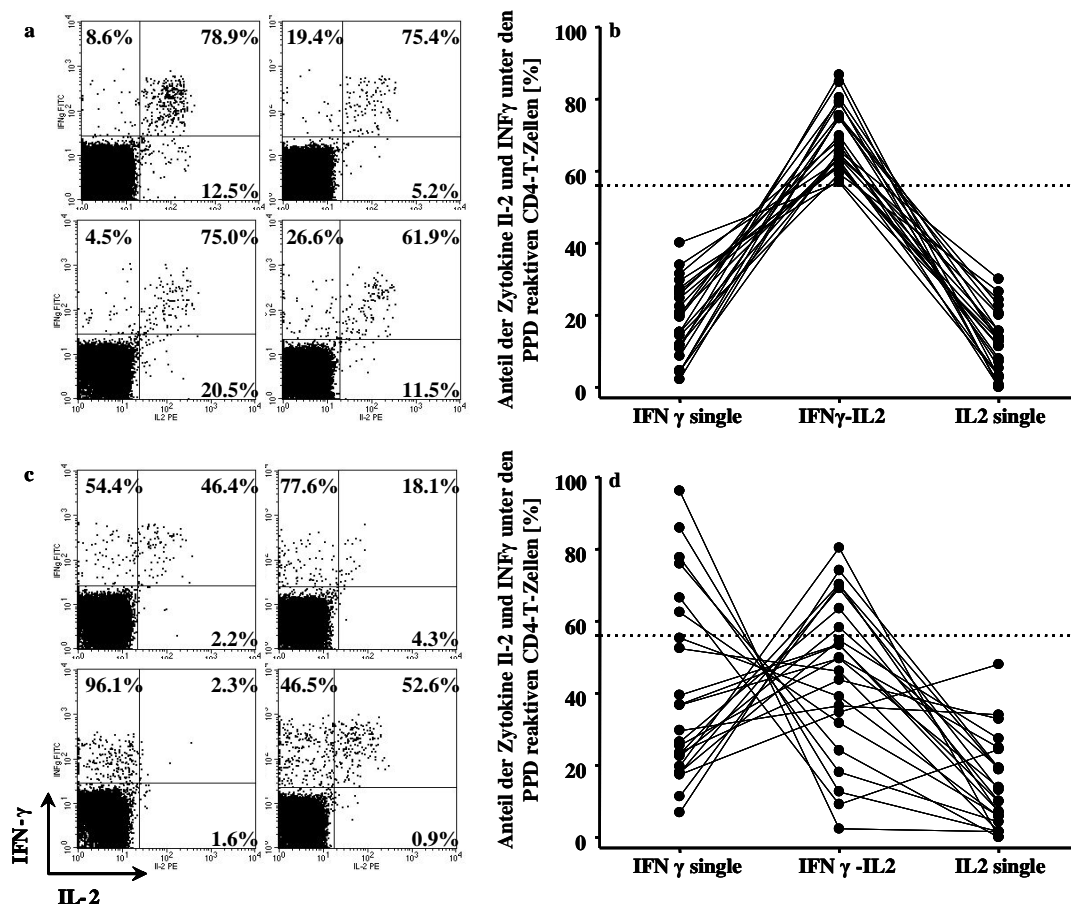
**Abb. 17. Höhere Frequenzen PPD spezifischer CD4-T-Zellen bei aktiver Tuberkulose.** Dargestellt wurden die Frequenzen reaktiver  $\text{IFN}\gamma$ -CD69 doppelt positiver Zellen gegen PPD für 24 Patienten mit aktiver Tuberkulose (A-TB, links) und 28 Patienten mit erfolgreich behandelter Tuberkulose (T-TB, rechts). Dabei lag der Median bei aktiver Infektion mit 0,71% zwar höher als bei der behandelten Infektion mit 0,33% ( $p=0,029$ , Mann Whitney Test), aufgrund der erheblichen Streuung mit einhergehender Überschneidung konnte für einen gemessenen Wert jedoch keine klar Zuordnung zu einer der Gruppen erfolgen.

#### 4.4.2 Hinweise auf aktive Tuberkulose durch verändertes Zytokinprofil

Um die diagnostische Spezifität des Vollblutverfahrens für eine aktive Tuberkulose-Infektion zu verbessern, wurden reaktive CD4-T-Zellen gegen PPD anhand der Expression von  $\text{IFN}\gamma$  und IL-2 charakterisiert. Diese Charakterisierung des Zytokinprofils konnte nur bei den Patienten mit nachgewiesener Reaktivität gegen PPD erfolgen (23/24 Patienten mit aktiver Tuberkulose und 23/28 Patienten mit stattgehabter Tuberkulose). Die PPD-Frequenzen mit Expression von  $\text{IFN}\gamma$  und/oder IL-2 lagen bei den Patienten mit aktiver Erkrankung im Vergleich zu denen mit abgelaufener Tuberkulose mit einem Median von 0,81% versus 0,39% signifikant höher ( $p=0,02$ ; graphisch nicht dargestellt). Bei einem Grenzwert der über die Expression dieser beiden Zytokine definierten PPD-reaktiven CD4-T-Zellen von  $>0,79\%$  lag die Sensitivität und Spezifität für die Zuordnung zur unbehandelten aktiven Tuberkulose bei 78% bzw. 52% (AUC = 0,63). Somit konnte durch einen hohen Anteil an diese Zytokine exprimierenden reaktiven Zellen eine aktive Tuberkulose wahrscheinlicher gemacht werden.

Unter den erfolgreich behandelten Patienten zeigte sich ein homogenes Zytokin-Profil mit

überwiegend IFN $\gamma$ -IL-2 doppelt positiven Zellen (Abb. 18a). Im Gegensatz dazu war der Anteil der beide Zytokine sezernierenden Zellen in Patienten mit aktiver Erkrankung signifikant niedriger ( $p < 0,0001$ , Mann-Whitney-Test) und das Profil zeigte eine starke Verschiebung hin zu den Zellen, welche nur IFN $\gamma$  exprimierten (Abb. 18c). Eine ROC-Analyse zeigte, dass ein Anteil von  $< 56\%$  der IFN $\gamma$ -IL-2 doppelt positiven Zellen unter allen reaktiven CD4-T-Zellen mit einer Spezifität von 100% (AUC 0,84) für eine aktive



**Abb. 18. Deutliche Unterscheidung des Zytokinmusters bei Patienten mit aktiver Tuberkulose.** Dargestellt wurden beispielhaft vier jeweils repräsentative Dotplots bei Patienten mit erfolgreich behandelter Tuberkulose (a) und aktiver Tuberkulose (c): Unter den reaktiven CD4-T-Zellen gegen PPD konnten Zellen, welche nur IFN $\gamma$  (linker oberer Quadrant) oder nur IL-2 exprimierten (rechter unterer Quadrant) von den IFN $\gamma$ -IL-2 doppelt positiven Zellen (rechter oberer Quadrant) unterschieden werden. Die prozentuale Aufteilung wurde in den Quadranten angegeben. Der Anteil der IFN $\gamma$ -IL-2 doppelt positiven Zellen war bei den Patienten mit aktiver Tuberkulose (c) deutlich reduziert zugunsten der IFN $\gamma$  einfach positiven Zellen. Diese prozentuale Aufteilung wurde für sämtliche 24 Patienten mit aktiver Tuberkulose (b) und 28 Patienten mit erfolgreich behandelter Tuberkulose (d) in Einzelkurven der Zytokinverteilung dargestellt.

Tuberkulose-Infektion sprach. Ein Anteil von  $> 56\%$  IFN $\gamma$ -IL-2-Zellen trat jedoch in beiden Kollektiven mit behandelter und aktiver Tuberkulose-Infektion auf (Sensitivität von 70%).

Zusammenfassend kann eine zelluläre Immunität auf *M. tuberculosis* durch Detektion

reaktiver CD4-T-Zellen auf PPD und vor allem auf die spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 nachgewiesen werden. Im zweiten Schritt liefert die Phänotypisierung der reaktiven CD4-T-Zellen gegen PPD richtungweisende Hinweise bei der Unterscheidung einer immunologisch aktiven von einer abgelaufenen Tuberkulose. So spricht ein Anteil von <56% der IFN $\gamma$ -IL-2 doppelt positiven Zellen (zugunsten der IFN $\gamma$  einfach positiven Zellen) für ein immunologisch frisches Geschehen. Umgekehrt kann bei einem höheren Anteil IFN $\gamma$ -IL-2 doppelt positiver Zellen eine aktive Tuberkulose nicht sicher ausgeschlossen werden.

## 5 Diskussion

Der Hauttest nach Mendel-Mantoux wird seit Jahrzehnten in einer in-vivo-Stimulation zum Screening bei Tuberkulose-Verdachtsfällen und deren Kontaktpersonen eingesetzt (DANIEL, 2006), obwohl er bekanntermaßen zu häufig fehlerhafte Ergebnisse liefert, um von einem sicheren diagnostischen Werkzeug sprechen zu können. Durch die Entwicklung neuer Verfahren zur Stimulation *M. tuberculosis*-spezifischer T-Zellen ex vivo könnte sich die Ära des Intrakutan-Tests jedoch dem Ende entgegen neigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues durchflusszytometrisches Vollblutverfahren im Vergleich zu dem etablierten Hauttest evaluiert; dies erfolgte sowohl bei Immungesunden als auch bei Patienten mit Immundefizienz. In Kooperation mit der rheumatologischen Abteilung der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim wurde des Weiteren die Wertigkeit beider Verfahren in einem klinisch relevanten prospektiven Setting untersucht. In einem letzten Teil der Arbeit ließ sich zeigen, dass das durchflusszytometrische Verfahren durch die Analyse von Zytokinprofilen die Möglichkeit bietet, mit hoher Spezifität eine aktive von einer erfolgreich behandelten Tuberkulose zu unterscheiden.

### 5.1 Die vergleichende Analyse des durchflusszytometrischen Verfahrens und des Hauttests nach Mendel-Mantoux durch den Einsatz des Tuberkulins in vitro und in vivo

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei 712 Patienten parallel zum Hauttest nach Mendel-Mantoux eine durchflusszytometrische Quantifizierung der reaktiven CD4-T-Zellen nach Kurzzeitstimulation mit Tuberkulin (PPD) durchgeführt. Obgleich PPD nicht *M. tuberculosis* spezifisch ist (DANIEL, JANICKI, 1978; HARBOE, 1981; TISSOT et al., 2005), wurde es dennoch in beiden Versuchsansätzen zunächst verwendet, um das Reaktivitätsprofil beider Verfahren direkt vergleichen zu können. Eine Korrelation zwischen der immunologisch vermittelten Antwort in vivo (Induration) und in vitro (reaktive CD4-T-Zellen) war nahe liegend, da beiden Verfahren die gleichen immunologischen Mechanismen zu Grunde liegen (ANDERSEN et al., 2000). Dem zufolge ergab sich bei der Analyse von 712 Patienten eine hochsignifikante Korrelation zwischen den Frequenzen reaktiver Zellen und den ausgemessenen Indurationen (4.1.1, Abb. 4). Durch eine ROC Analyse wurde ein Grenzwert von 0,115% PPD-reaktiver CD4-T-Zellen ermittelt, der einer Induration von 15 mm entspricht (4.1.2, Abb. 5 und Tab. 9). Interessanterweise wiesen die 519 Immungesunden eine bessere Korrelation ( $r=0,5749$ ) im Vergleich zu den 193 Immunkompromittierten auf

( $r=0,5318$ ). Es ist bekannt, dass der Hauttest bereits bei Immungesunden zu falsch negativen Ergebnissen führen kann (HAAS, BRODHUN, 2006) und dass dieser Anteil bei Immunkompromittierten deutlich höher liegt. Eine geringe Sensitivität des Hauttestes findet sich bei Patienten mit verschiedenen Ursachen der Immundefizienz wie terminale Niereninsuffizienz (SMIRNOFF et al., 1998; WOELTJE et al., 1998; SESTER et al., 2004), HIV-Infektion (COBELENS et al., 2006; SWAMINATHAN et al., 2008), nach Transplantation (SESTER et al., 2006) oder bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen (PONCE DE LEON et al., 2008; TRIVERIO et al., 2009). Dementsprechend fand sich bei der qualitativen Auswertung der Ergebnisse bei den Immunkompromittierten ein höherer Anteil an diskordanten Ergebnissen, der sich im Wesentlichen auf eine höhere Empfindlichkeit der Durchflusszytometrie zurückführen lässt (4.1.1, Tab. 8). Während bei den Immungesunden unter den durchflusszytometrisch positiv Getesteten 62,1% (185/298) eine nachweisbare Induration im Hauttest aufwiesen, lag der Anteil bei den Immunkompromittierten bei lediglich 38,6% (39/101). Demgegenüber wiesen nur 1% unter den Immungesunden und nur 3 Patienten unter den Immunkompromittierten einen positiven Hauttest ohne Nachweis PPD-reaktiver Zellen auf, so dass ein höherer negativer prädiktiver Wert für die Durchflusszytometrie angenommen werden kann. Das Verfahren bietet sich somit als Ausschlussverfahren für einen relevanten immunologischen Kontakt an. Die höhere Empfindlichkeit der Durchflusszytometrie bei moderater Immunsuppression (SESTER et al., 2004; SESTER et al., 2006) lässt sich vermutlich auf die besseren Stimulationsbedingungen in vitro mit höherem Anteil spezifischer T-Zellen unter Verwendung von kostimulatorischen Antikörpern (WALDROP et al., 1998) zurückführen. Bei Patienten mit Hochdosis-Immunsuppression kann jedoch auch die durchflusszytometrische Detektion *M. tuberculosis*-spezifischer CD4-T-Zellen beeinträchtigt sein (SESTER et al., 2009). Der Einfluss der Höhe der Immundefizienz auf die Reaktivität in vitro wird von uns derzeit in einer europäischen Multicenterstudie untersucht.

Da die durchflusszytometrische Detektion PPD-reaktiver Zellen lediglich das sensitivere Pendant zum Hauttest darstellt, das Ergebnis jedoch aufgrund der mangelnden Spezifität des Tuberkulins (COMSTOCK, 1975; LALVANI et al., 2001; WANG et al., 2002; FARHAT et al., 2006) nicht zur Einleitung weiterer therapeutischer Maßnahmen benutzt werden sollte, ist die alleinige Verwendung von Tuberkulin eher von theoretischem Interesse. Dennoch unterstreichen diese Ergebnisse die besondere Sensitivität der Durchflusszytometrie, von der anzunehmen ist, dass sie auch für andere Antigene gilt.

## **5.2 Die durchflusszytometrische Charakterisierung der T-Zellantwort gegen die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10**

### **5.2.1 Erhöhte Spezifität durch Kombination des Tuberkulins mit den *M. tuberculosis* spezifischen Antigenen in der *in-vitro*-Stimulation**

Bei immunologischen Tests in der Tuberkulose-Diagnostik wird zunehmend Tuberkulin durch die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 ergänzt oder ersetzt. Da PPD nicht erregerspezifisch detektiert und vor allem in Gebieten mit hoher BCG-Impfrate zu falsch positiven Ergebnissen führen kann (TISSOT et al., 2005), wurde versucht, zielgenauer eine zelluläre Immunität durch spezifischere Antigene nachzuweisen. Die Spezifität der über die „Region of difference 1“ (RD1) kodierten Antigene ESAT-6 und CFP-10 beruht auf einer Deletion der diese Proteine kodierenden Gensequenz in den BCG-Impfstämmen sowie den meisten anderen Mykobakterien (ANDERSEN et al., 2000). Hierdurch ergab sich erstmals die Möglichkeit, Personen mit stattgehabtem Kontakt von solchen mit reiner BCG Impfantwort zu unterscheiden. In unserer durchflusszytometrischen Analyse bei 593 immunkompetenten Individuen zeigte etwa die Hälfte aller Probanden keine Reaktivität. Unter den verbleibenden ca. 50% wies wiederum etwa die Hälfte eine alleinige Reaktivität gegen PPD (mutmaßliche BCG Impfantwort), die andere Hälfte gegen mindestens eines der spezifischen Antigene auf (Patienten mit stattgehabter, aktiver oder latenter Infektion; 4.2.1, Abb. 6). Unabhängig von der Methode des Reaktivitätsnachweises konnten diese Reaktivitätsprofile auch in anderen Studien durch verschiedene Interferon-Gamma-release-Assays (IGRA) nachgewiesen werden (HUGHES et al., 2005; SESTER et al., 2006; COSMI et al., 2007; DOMINGUEZ et al., 2008; DIEL et al., 2010; SIMSEK et al., 2010). Zur Kostenersparnis bzw. aus Praktikabilitätsgründen wäre auch ein gemeinsamer Einsatz der spezifischen Antigene möglich, da die Summe der Einzelfrequenzen der Frequenz eines gemeinsamen Ansatzes mit einem Korrelationskoeffizient  $r=0,96$  entspricht (4.2.1, Abb. 7). Dies ist bei dem kommerziell erhältlichen QuantiFERON Assay realisiert, bei dem Peptide dreier spezifischer Antigene in einem Stimulationsansatz kombiniert werden.

Beim Vergleich der Frequenzen der CD4-T-Zellen korrelierten die Frequenzen der spezifischen Antigene sowohl untereinander als auch mit denen des weniger spezifischen Tuberkulins signifikant (4.2.2, Abb. 8). Dies verdeutlicht den Zusammenhang zwischen der durch ESAT-6 und der durch CFP-10 vermittelten Immunantwort und deren Anteil an der PPD-induzierten Reaktivität. Auf Basis der o.g. Unterteilung in verschiedene

Reaktivitätsmuster stellten wir uns die Frage, ob Individuen mit reiner BCG-Impfantwort eine geringere Frequenz PPD-reaktiver T-Zellen aufweisen als Probanden mit stattgehabtem Kontakt mit *M. tuberculosis*. Dies war in der Tat der Fall (4.2.4, Abb. 11), denn die Frequenzen PPD-reaktiver CD4-T-Zellen in der Gruppe der ESAT-6/CFP-10-negativen Probanden war signifikant niedriger als in allen anderen Gruppen. Innerhalb des Kollektivs mit ESAT-6/CFP-10-spezifischer Immunität war die Frequenz PPD-reaktiver CD4-T-Zellen am höchsten, wenn eine Reaktivität gegen sowohl ESAT-6 als auch CFP-10 vorlag. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine stattgehabte Infektion mit *M. tuberculosis* zu einer ausgeprägteren Stimulation und Aufrechterhaltung einer PPD-spezifischen Immunantwort führt als dies bei reiner BCG-Impfantwort der Fall ist. Darüberhinaus korrelieren diese Beobachtungen auch mit der empirisch ermittelten Grenze der Hauttest-Induktion, bei welcher lediglich Indurationen >15mm bei Immunkompetenz als klinisch relevant angesehen werden.

### ***5.2.2 Nachweis der latenten Tuberkulose (LTBI) mittels Durchflusszytometrie bei Immungesunden und Patienten mit Immundefizienz***

Durch Stimulation mit allen drei Antigenen wurden 781 Individuen auf eine zelluläre Immunität gegen *M. tuberculosis* analysiert und anhand ihrer Reaktivität gegen PPD sowie ESAT-6/CFP-10 stratifiziert. Die Frequenzen PPD reaktiver T-Zellen lagen bei den immunkompromittierten Individuen im Gegensatz zu den Immungesunden durchschnittlich niedriger, für die anderen Antigene ergab sich diese Beobachtung zwischen den beiden Unterkollektiven jedoch nicht. Dies könnte durch eine höhere Immunogenität der spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 bedingt sein, was eine höhere Zytokinproduktion pro Einzelzelle bedingen könnte. Es wäre daher denkbar, dass eine ESAT-6/CFP-10 Reaktivität bei Immunsuppression weniger schnell unter die Nachweisgrenze fällt als dies bei Stimulation mit PPD der Fall ist. Bei den Immunkompromittierten war der Anteil an PPD-negativen Individuen zwar höher, unter den verbleibenden 43% PPD-positiven Individuen fanden sich jedoch mehr als die Hälfte der Individuen mit zellulärer Immunität gegen ESAT-6 und/oder CFP-10 (4.2.3, Abb. 9), wobei der Anteil der doppeltpositiven höher war als bei den Immunkompetenten. In die Kategorie der mutmaßlich BCG-Geimpften bzw. Probanden mit Kontakt zu anderen Mykobakterien fielen 28% der Immungesunden und 20% der Immunkompromittierten.

Es stellt sich die Frage, ob die Verwendung des Tuberkulins in vitro nicht entbehrlich wäre. In anderen IGRA wie dem QuantiFERON Test oder dem T-SPOT.TB wird auf das Tuberkulin bereits verzichtet und führt dadurch zu einer Kostenersparnis. Dadurch ist der Nachweis bzw.



die Abgrenzung einer BCG-Immunsierung oder einer Immunantwort gegen nicht tuberkulöse Mykobakterien jedoch nicht mehr möglich.

In unserer durchflusszytometrischen Analyse wurde der Grenzwert analog zum PPD auch für die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene mit 0,05% festgelegt. Es wäre jedoch zu erwägen, ob diese Grenze ähnlich wie in einigen durchflusszytometrischen Assays deutlich niedriger angesetzt werden könnte (TESFA et al., 2004; HUGHES et al., 2005), was jedoch das Risiko einer falsch positiven Reaktion mit sich brächte. Zur Minimierung dieses Risikos kann jedoch zusätzlich auf die visuelle Beurteilung des durchflusszytometrischen Dotplots zurückgegriffen werden, bei der eine klar abgrenzbare Punktwolke trotz niedriger Frequenz als spezifisch gewertet werden kann.

Eine Auswertung der durchflusszytometrischen Daten abhängig vom Expositionsrisiko erbrachte weitere interessante Details (4.2.3, Abb. 10): Unter den 748 Individuen, bei denen das Expositionsrisiko abschätzbar war, wurden drei Untergruppen gebildet: je eine Gruppe mit geringem und erhöhtem Expositionsrisiko und eine Gruppe von Patienten mit nachgewiesener oder anamnestisch erinnelter Tuberkulose. Mit zunehmender Exposition nahm wie erwartet auch der Anteil an PPD-positiven Individuen zu. Während unter den PPD-positiven Individuen in der Gruppe mit geringer Exposition 53,09% keine Reaktivität auf die spezifischen Antigene aufwies und somit dem Kollektiv der mutmaßlich BCG-Geimpften zugeordnet wurden, lag der Anteil ESAT-6/CFP-10 negativer Befunde bei dem Kollektiv mit Tuberkulose bei lediglich 27,78% (15/54). Ein Verlust einer spezifischen Reaktivität bei erfolgreich behandelter Infektion scheint tatsächlich mit zunehmendem zeitlichen Abstand zur Therapie aufzutreten (EWER et al., 2006). Unerwartet war in der Gruppe mit erhöhtem Expositionsrisiko der hohe Anteil der PPD-positiven Individuen ohne Reaktivität auf die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene (73,21%). Dies ist insofern erstaunlich, da wir ähnlich wie bei Probanden mit stattgehabter Tuberkulose annahmen, dass bei zunehmender Exposition der Anteil der Reaktivität gegen ESAT-6 und/oder CFP-10 stark steigen müsste. Dieses Kollektiv umfasste einen großen Anteil an Personal (86,02%) mit dauerhaftem oder wiederholtem Patienten- bzw. Probenkontakt. Darunter fielen Krankenschwestern und Ärzte sowie Mitarbeiter aus dem mikrobiologischen Institut. Hier könnte der hohe Anteil an alleiniger Reaktivität gegen PPD am ehesten als Booster-Reaktion einer bestehenden zellulären Immunität gegen *M. bovis* BCG oder atypische Mykobakterien durch wiederholten mykobakteriellen Kontakt zu deuten sein. Ohne eine derartig wiederholte Exposition wäre der Anteil der sowohl durchflusszytometrisch als auch mittels Hauttest nachgewiesenen

Impfantworten und deren Frequenz bzw. Induration deutlich geringer zu erwarten. In ähnlicher Weise zeigte BCG-geimpftes Pflegepersonal in Korea mit häufiger Exposition zu Tuberkulosepatienten eine 100%ige IFN $\gamma$ -Reaktivität auf PPD, wobei nur 52% eine Reaktivität auf die spezifischen Antigene mittels QuantiFERON Test aufwiesen (EUM et al., 2008). Daneben ist bekannt, dass auch schon das serielle Anlegen von Tuberkulin Hauttests, wie es im medizinischen Sektor häufig geschieht, zu einer Boosterung der reaktiven Antwort in vivo (HOROWITZ et al., 1995; SAGHEB et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2008; DEL RIO CAMACHO et al., 2009) führen kann. Ob eine derartige Immunantwort auch mit einem direkten Schutz gegenüber *M. tuberculosis* assoziiert ist, müssen prospektive Studien zeigen. Wie eine derartige in vitro nachgewiesene Boosterreaktion gedeutet werden kann, muss aufgrund der divergenten Datenlage noch offengelassen werden (IGARI et al., 2007; SAUZULLO et al., 2011).

Die Durchflusszytometrie stellt unter Verwendung von PPD, ESAT-6 und CFP-10 ein wertvolles diagnostisches Instrument zum Nachweis einer zellulären Immunität gegen *M. tuberculosis* dar. Dabei lassen sich durch das Verfahren wichtige Erkenntnisse über die mittels Hauttest unterschätzte Prävalenz bei stark exponierten und/oder immundefizienten Individuen gewinnen.

### **5.3 Die Wertigkeit der Durchflusszytometrie im Vergleich mit anderen Interferon-Gamma-Release-Assays (IGRA) und einem <sup>3</sup>H-Thymidin-basiertem Proliferationsassay**

Um die diagnostische Wertigkeit der durchflusszytometrischen Detektion auch in Hinblick auf die anderen Interferon-Gamma-Release-Assays (IGRA) zu evaluieren, verglichen wir die FACS-Analyse zum Nachweis von latenten Tuberkulose- und CMV-Infektionen (SESTER et al., 2000; SESTER et al., 2001; SESTER et al., 2003) mit zwei kommerziellen ELISPOT-Assays (4.2.5, Abb. 12 - 14). Für den Vergleich wählten wir den T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford) und den ELISPOT ELSP 5000 IFN $\gamma$  (AID GmbH, Straßberg). Es zeigte sich für beide Systeme eine hochsignifikante Korrelation von  $r=0,8812$  ( $p<0,0001$ ) mit der Durchflusszytometrie bezogen auf die jeweils errechneten Frequenzen reaktiver CD4-T-Zellen. Alleine durch dieses Ergebnis schienen sich die beiden ELISPOT-Assays nicht zu unterscheiden, zumal ihre Ergebnisse untereinander ebenfalls hochsignifikant mit  $r=0,9241$  korrelierten. Bei der qualitativen Analyse der Positivkontrolle mit SEB ergab sich in allen Messungen eine 100%ige Konkordanz. Für die restlichen Antigene ergab sich für den Vergleich der Durchflusszytometrie mit T-SPOT.TB im Gegensatz zu ELSP 5000 IFN $\gamma$  ein höherer Kappa-Koeffizient mit  $\kappa=0,78$  versus  $\kappa=0,62$  (4.2.5, Tab. 11). Bei genauerer

Betrachtung fanden sich für ELSP 5000 IFN $\gamma$  18,7% diskordante Ergebnisse mit der Durchflusszytometrie, wobei jeweils sechs positive Messungen von dem anderen System nicht erkannt wurden. Bei dem T-SPOT.TB hingegen konnte unter 64 ausgewerteten Messungen kein positives Ergebnis ermittelt werden, welches nicht auch durch die Durchflusszytometrie erkannt worden wäre. Umgekehrt fanden sich in der Durchflusszytometrie knapp 11% positive Ergebnisse, welche durch den T-SPOT.TB nicht erkannt worden waren. Eine ähnlich hohe Rate an in der Durchflusszytometrie positiven und im ELISPOT negativen diskordanten Ergebnissen fand sich auch bei ELSP 5000 IFN $\gamma$ . Dies weist auf eine höhere Empfindlichkeit der Durchflusszytometrie hin. Zudem zeigte sich die Auszählung der Spots bei dem ELISPOT ESLP 5000 IFN $\gamma$  aufgrund mangelnder Diskriminierung der einzelnen Spots voneinander und durch Farbestablagerungen in den Vertiefungen beeinträchtigt. Eine visuelle Nachkontrolle war nötig, um nicht aufgrund der scheinbaren Verschmelzung der Spots ein falsch negatives Ergebnis durch das Reader-System zu riskieren.

Die FACS-Analyse zeigte sich hinsichtlich der qualitativen und quantitativen Ergebnisse beim Nachweis einer zellulären Immunität gegen Tuberkulose und anderer Erreger den kommerziellen ELISPOT-Systemen mindestens gleichwertig. Zudem ist sie durch eine erhebliche Zeitersparnis und erhöhte Praktikabilität im Versuchsaufbau gekennzeichnet (keine Isolation von PBMC notwendig) und bietet die Möglichkeit der weiteren Phänotypisierung der reaktiven Zellen.

Als Alternative zum Nachweis von Oberflächenrezeptoren und Zytokinen auf reaktiven Zellen kann die Reaktivität gegen ein spezifisches Antigen mittels  $^3\text{H}$ -Thymidin-basierter Zellproliferation nachgewiesen werden. Insbesondere bei Stimulation mit ESAT-6 zeigte jedoch ein erheblicher Anteil von Probanden trotz durchflusszytometrischer Detektion reaktiver T-Zellen keine nennenswerte Zellproliferation, so dass diese Methodik nicht zur Diagnose einer latenten Tuberkulose-Infektion geeignet scheint. Umgekehrt legt eine Studie bei 68 Patienten mit rheumatischen Erkrankungen nahe, dass eine CFP-10 spezifische Zellproliferation auch bei einigen Individuen, welche mittels ELISPOT negativ auf das Antigen getestet worden waren, vorkommen kann (SELLAM et al., 2007). Ähnlich inhomogen ist die Studienlage bei anderen Arbeiten, bei denen  $^3\text{H}$ -Thymidin-gestützte Proliferationsassays zur Anwendung kamen (ONWUBALILI, 1987; SUTHERLAND et al., 2006; SELLAM et al., 2007; HERNANDEZ et al., 2008), so dass in praktischer Hinsicht die IFN $\gamma$  basierten Verfahren den Proliferationsassays durch die kürzere Stimulationszeit

überlegen zu sein scheinen.

Im Folgenden sollen einige Überlegungen zu den verfügbaren Interferon-Gamma-Release-Assays und ihrem Nutzen zur Diagnostik der latenten und manifesten Tuberkulose-Infektionen angestellt werden: Bei den ELISPOT-Assays, die ELISA-basierten Tests und der durchflusszytometrische Detektion (JANOSSY et al., 2008) wird der Anteil reaktiver Zellen durch IFN $\gamma$ -Expression bestimmt. In der Tuberkulose-Diagnostik finden kommerzielle und hausinterne (MANTEGANI et al., 2006) ELISPOT Systeme weltweit breite klinische Anwendung. Bei standardmäßiger Verwendung von ESAT-6 und CFP-10 zeigt sich der T-SPOT.TB im Vergleich zu dem Tuberkulin-Hauttest spezifischer und sensitiver (LALVANI, PAREEK, 2009; DIEL et al., 2010; ONI et al., 2010; SIMSEK et al., 2010). Daneben hat sich der QuantiFERON Test (Cellestis International, Australien) mit QuantiFERON-TB Gold (QFT-G) und QuantiFERON-TB Gold in-Tube (QFT-GIT) durch Messung des von reaktiven Zellen exprimierten IFN $\gamma$  mittels ELISA aus dem Überstand etabliert. Eine weitere Charakterisierung der Subpopulationen unter den reaktiven Zellen und der (gleichmäßigen) Verteilung der Zytokinexpression unter ihnen werden dadurch jedoch nicht gewonnen. Zur Stimulation kommen die überlappenden Peptide ESAT-6 und CFP-10 zum Einsatz, in dem QFT-GIT in einem gemeinsamen Einsatz zusätzlich Antigen TB7.7 (Rv2654), welches ebenfalls nicht in *M. bovis* BCG und den meisten anderen Mykobakterien vorkommt (BROCK et al., 2004). Nach Studienlage scheint die Sensitivität des QuantiFERON Tests im Vergleich zum Hauttest mindestens genau so hoch (LALVANI, PAREEK, 2009) oder höher zu sein (KIM et al., 2009a; DIEL et al., 2010; SYED AHAMED KABEER et al., 2010). Im direkten Vergleich des T-SPOT.TB mit den konkurrierenden QuantiFERON Tests zeigt sich in verschiedenen Studien für den ELISPOT eine 3% bis 25% höhere Sensitivität (FERRARA et al., 2006; LEE et al., 2006; ADETIFA et al., 2007; KANG et al., 2007; DOMINGUEZ et al., 2008), wobei es Hinweise gibt, welche auf eine etwas bessere Spezifität der QuantiFERON Tests schließen lässt (LEE et al., 2006; DETJEN et al., 2007; LALVANI, PAREEK, 2009; DIEL et al., 2010). So bestimmten Diel et al. 2010 in einer Metaanalyse von 25 eingeschlossenen Studien die gepoolte Sensitivität des Hauttests mit 70%, des QFT-GIT mit 81% und des T-SPOT.TB mit 88%, wobei die Spezifität des QFT-GIT mit 99% höher lag als bei dem T-SPOT.TB mit 86% (DIEL et al., 2010). Man könnte spekulieren, dass die höhere Spezifität durch den zusätzlichen Einsatz des Antigens TB7.7 begründet sei. Im Bereich der extrapulmonalen Tuberkulose-Infektion scheint der QFT-G nur erniedrigte Raten an positiven Ergebnissen detektieren zu können (SONG et al., 2009). Problematisch ist das Auftreten einer im Vergleich zum T-SPOT.TB signifikant erhöhten Rate an nicht

interpretierbaren Ergebnissen („indeterminate“) des QFT-G bei Vorliegen einer medikamentösen Immunsuppression (FERRARA et al., 2006; KLEINERT et al., 2010) oder bei Testungen im Kindesalter (BERGAMINI et al., 2009). Bei Kindern und Jugendlichen können negative Hauttests nicht sicher eine zelluläre Immunität ausschließen. Zudem sind Infektionen wie zervikale Lymphadenitis durch nicht-tuberkulöse Mykobakterien gehäuft. Trotz dürftiger Studienlage scheinen QuantiFERON und T-SPOT.TB zur Diagnostik der latenten und aktiven Tuberkulose im Kindesalter herangezogen werden zu können (DETJEN et al., 2007; BERGAMINI et al., 2009; CHOU et al., 2009; HANSTED et al., 2009). Bei einem Vergleich beider Systeme durch Detjen et al. bei Kindern und Jugendlichen in einem Niedrig-Inzidenzgebiet in Deutschland ergab sich für beide eine Sensitivität von 93%, außerdem konnten dadurch andere nicht-tuberkulöse mykobakterielle Infektionen besser abgegrenzt werden als durch Intrakutantestung (DETJEN et al., 2007). Auch bei Ko-Infektionen mit HIV, welche mit einem erhöhten Risiko für eine Tuberkulose-Infektionen einhergehen (MTEI et al., 2005), scheint der T-SPOT.TB ohne relevante Unterschiede zur HIV-negativen Gruppe LTBI diagnostizieren zu können (CATTAMANCHI et al., 2010; MUTSVANGWA et al., 2010). Inwieweit jedoch auch eine aktive Tuberkulose erfolgreich in HIV-positiven Patienten detektiert werden kann, ist nach derzeitiger Studienlage noch umstritten (JIANG et al., 2009; CATTAMANCHI et al., 2010; ONI et al., 2010). So scheint dies mit der die IGRA limitierenden CD4-Zellzahl zusammenzuhängen, welche je nach Stadium der HIV-Infektion erheblich reduziert sein kann. Hier könnte die durchflusszytometrische Analyse durch das gezielte Gaten auf die verbleibende CD4-T-Zellen günstigere Ergebnisse liefern (JANOSSY et al., 2008).

In der durchflusszytometrischen Detektion reaktiver Zellen können je nach Versuchsaufbau nach Vollblutstimulation oder Stimulation separierter PBMC im Anschluss durch Mehrfachfärbung nicht nur IFN $\gamma$  als Aktivierungsmarker sondern auch andere Zytokine oder Oberflächenrezeptoren herangezogen werden. In unserem Versuchsaufbau wurden unter den CD4-T-Zellen diejenigen als reaktiv definiert, welche zusätzlich zum IFN $\gamma$  auch den Oberflächenrezeptor CD69 als frühen Aktivierungsmarker aufwiesen (MASON et al., 2001). So konnten auch Avgustin et al. 2005 die CD69-Expression auf CD4-T-Zellen nach PPD-Stimulation in BCG-geimpften oder *M. tuberculosis*-infizierten Individuen durchflusszytometrisch nachweisen (AVGUSTIN et al., 2005). Auch die Verwendung von TNF $\alpha$  als Aktivierungsfaktor kann *M. tuberculosis* spezifische CD4-T-Zellen nachweisen und korreliert mit der Detektion von IFN $\gamma$  (SESTER et al., 2004). Cosmi et al. konnten 2007 eine signifikante Korrelation von  $r=0,58$  ( $p<0,001$ ) der durchflusszytometrisch detektierten auf

PPD reaktiven CD69-TNF $\alpha$  doppelpositiven Zellen mit denen im Hauttest ermittelten Indurationen nachweisen, die Verwendung von IFN $\gamma$  lieferte ähnliche Ergebnisse. Eine BCG-Immunisierung wurde hierbei durch zusätzliche Verwendung von ESAT-6 ausgeschlossen (COSMI et al., 2007). Janossy et al. 2008 zeigten in einem systematischen Review, dass die meisten Flow-Protokolle gut zum Nachweis einer zellulären Immunität geeignet sind, sofern dafür der Anteil der IFN $\gamma$  exprimierenden CD4 positiven Lymphozyten herangezogen wird (JANOSSY et al., 2008).

Zusammenfassend stellen die IGRA sinnvolle diagnostische Instrumente zum Nachweis einer zellulären Immunität gegen *M. tuberculosis* dar, obgleich sich durch Detektion von IFN $\gamma$  per se eine latente Infektion nicht zuverlässig von einer aktiven Erkrankung mit *M. tuberculosis* abgrenzen lässt (SESTER et al., 2011a). Die Systeme weisen eine gegenüber dem Hauttest erhöhte Sensitivität und Spezifität auf und sind in der Lage, eine BCG-Immunisierung von einer echten Infektion mit *M. tuberculosis* zu unterscheiden. Während der T-SPOT.TB in den meisten Studien sensitiver und geringfügig weniger spezifisch als die QuantiFERON Tests bewertet wurde, muss die Validität der durchflusszytometrischen Analyse noch durch weitere vergleichende Studien evaluiert werden, obgleich bei hochsignifikanter Korrelation unseres Assays mit zwei ELISPOT-Assays ähnlich gute Ergebnisse bei rascherer Durchführbarkeit zu erwarten sind.

Bei der Anwendung aller IGRA muss kritisch hinterfragt werden, inwieweit Patienten mit positivem Testergebnis einer präventiven Therapie zugeführt werden sollten. Der klinische Kontext muss dabei berücksichtigt werden, denn grundsätzlich sollte ein Screening nur dann erfolgen, wenn anhand der Anamnese und der mutmaßlichen Exposition ein erhöhtes Risiko einer latenten Infektion vorliegt und so auch therapeutische Maßnahmen spezifischer an das individuelle Risiko angepasst werden. So wird in den Leitlinien der USA zum Gebrauch der IGRA ein je nach Alter, Impfstatus und Exposition individueller stufenweiser Einsatz von IGRA und/oder Hauttest bzw. deren Kombination empfohlen (ERKENS et al., 2010; MAZUREK et al., 2010). Kein Diagnostikum sollte zu einem nicht hinterfragtem Screening eingesetzt werden, da dadurch auch die Rate an falsch positiven Ergebnissen zwangsläufig steigen wird (MAZUREK et al., 2010; MANCUSO et al., 2011).

#### **5.4 Durchflusszytometrische Diagnostik der latenten Tuberkulose bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen vor Therapie mit TNF-Antagonisten**

Zur Evaluierung der durchflusszytometrischen Analyse schlossen wir neben den Hämodialyse- und Nierentransplantationspatienten (SESTER et al., 2004; SESTER et al., 2006) ein Kollektiv von 97 Patienten mit rheumatischen Erkrankungen und damit einhergehender iatrogener Immundefizienz durch Kortikosteroide oder DMARD ein. Bei den Patienten sollte die Indikation zur Therapie mit TNF-Antagonisten geprüft und eine latente Tuberkulose-Infektion aufgrund der Gefahr der Reaktivierung ausgeschlossen werden. Welche Patienten mit latenter Infektion unter Therapie mit TNF-Antagonisten eine aktive Tuberkulose entwickeln, ist in prospektiven Studien noch nicht hinreichend untersucht. Eine Abnahme von CD8-Effektor-Gedächtniszellen (BRUNS et al., 2009), aufgrund derer die antimikrobielle Abwehr gegen die intrazellulären Bakterien geschwächt wird, wird vermutet.

Wir analysierten in dieser prospektiven Studie verschiedene Screening-Ansätze auf ihre Eignung zur Diagnosestellung einer latenten Tuberkulose. Der zu dem Zeitpunkt empfohlene Standard mit Anamneseerhebung, körperlicher Untersuchung, Hauttest nach Mendel-Mantoux und Röntgen Thorax (FURST et al., 2006) wurde ergänzt durch die durchflusszytometrische Detektion *M. tuberculosis* spezifischer CD4-T-Zellen. Auch hier stellt der klinisch gut etablierte Hauttest aufgrund seiner mangelnden Sensitivität schon bei Immungesunden (HAAS, BRODHUN, 2006) und der mangelnden Abgrenzung einer latenten Infektion von einer BCG-Impfung keinen Goldstandard dar. Es zeigte sich, dass die Häufigkeit der Exposition mit *M. tuberculosis* auch in einem Niedrigprävalenzgebiet im Verlauf eines Lebens höher einzuschätzen ist, als durch die Ergebnisse des Hauttestes bei den Immunsupprimierten zu vermuten ist (SESTER et al., 2004; SESTER et al., 2006; PONCE DE LEON et al., 2008; TRIVERIO et al., 2009). So konnten durch den Hauttest 13 Patienten identifiziert werden, durch PPD-reaktive CD4-T-Zellen jedoch 39 Personen (4.3.1, Tab. 13). Dieser Vergleich macht erneut die höhere Sensitivität der Durchflusszytometrie sichtbar und legt nahe, dass die Immundefizienz kein relevantes Hindernis für den Nachweis einer PPD spezifischen Immunantwort in vitro darzustellen scheint. Beim Vergleich der Indurationsergebnisse und der Frequenzen PPD-reaktiver CD4-T-Zellen zeigte sich bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen erwartungsgemäß eine schwächere Korrelation ( $r=0,48$ ) als bei Immungesunden ( $r=0,57$ ) (4.1.1, Abb. 4).

Bei der Verwendung von PPD sowie der *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 müssten aufgrund der Koppelung von höherer Sensitivität und höherer Spezifität

latent infizierte Individuen besser erkannt und von einer BCG-Immunisierung unterschieden werden können. Fast alle Individuen (92%) mit positivem Hauttest-Ergebnis zeigten auch eine Reaktivität auf PPD, umgekehrt reagierte nur knapp ein Drittel (31%) der PPD-positiven Patienten auch mit einer messbaren Induration im Hauttest, was die geringe Empfindlichkeit des Hauttestes widerspiegelt (4.3.2, Tab. 14). Von 39 Patienten mit PPD-Reaktivität wiesen 14 auch reaktive Zellen gegen ESAT-6 bzw. CFP-10 auf. Diese 14 Individuen gehörten somit zu dem Kollektiv der latent infizierten, bei den restlichen 25 Patienten könnte man eine BCG-Immunisierung als wahrscheinlichste Ursache annehmen. Diese 25,8% (25/97) erscheinen dabei eine realistischere Impfquote als die nur durch die Anamnese und medizinischen Unterlagen ermittelten 5,2% darzustellen. Da nur 6 von 13 Patienten mit positivem Hauttest eine Reaktion gegen ESAT-6 oder CFP-10 zeigten, scheint mehr als die Hälfte aller Hauttest-Reaktivitäten durch eine BCG-Impfung oder eine Infektion mit nicht-tuberkulösen Mykobakterien bedingt zu sein. Von den fünf Patienten mit erinnerter oder aktiver Tuberkulose zeigten vier eine Reaktivität gegen ESAT-6 bzw. CFP-10, während lediglich drei auch durch den Hauttest erkannt wurden. Der Einsatz der spezifischeren Antigene ESAT-6 und CFP-10 lieferte auch zusätzlich andere positiv getesteten Individuen als die durch den Hauttest detektierten Personen. Wenngleich sich kommerzielle IGRA auf diese Antigene beschränken, wird die erhöhte Sensitivität des durchflusssytometrischen Verfahrens durch vergleichende Verwendung von PPD in vitro und im Hauttest deutlich.

Auch in dieser Arbeit zeigte die Durchflusssytometrie eine gute Korrelation zu den Ergebnissen des kommerziellen ELISPOT Verfahrens; zudem erwiesen sich die in vitro-Verfahren in der klinischen Testung bei Patienten mit unterschiedlicher Ursache der Immundefizienz als praktikabler als der Hauttest (SESTER et al., 2004; SESTER et al., 2006; MUTSVANGWA et al., 2010). Trotz ähnlicher Ergebnisse bei Anwendung des QuantiFERON Tests und der ELISPOT Verfahren (CASAS et al., 2009; MARTIN et al., 2010), scheint es hierbei unter immunsuppressiver Therapie häufiger zu nicht interpretierbaren Ergebnissen zu kommen, als dies in dieser Arbeit mit der Durchflusssytometrie der Fall war (FERRARA et al., 2006; KLEINERT et al., 2010). Nicht-interpretierbare Ergebnisse waren dabei im Wesentlichen auf eine eingeschränkte Reaktivität in der Positivkontrolle zurückzuführen. Beide kommerziellen Testsysteme wurden erfolgreich zum Screening auf eine latente Tuberkulose bei Vorliegen rheumatischer Erkrankungen in einzelnen Studien eingesetzt (COBANOGLU et al., 2007; BOCCHINO et al., 2008; BEHAR et al., 2009).



Wir evaluierten verschiedene Screening-Algorithmen zur Identifikation latent infizierter Individuen, um eine für die klinische Umsetzung bessere Praktikabilität zu erreichen (4.3.2, Abb. 16). Dabei wurden in allen Diagnosepfaden die Anamnese und der Röntgen-Thorax zusätzlich zu dem etablierten Hauttest (Pfad A) oder der Durchflusszytometrie mit PPD (Pfad B) oder ESAT-6/CFP-10 (Pfad C) verwendet. Dabei wies Pfad B unter Berücksichtigung der PPD-Reaktivität in vitro mit 35 identifizierten Individuen aufgrund der höheren Sensitivität die höchste Anzahl positiv getesteter Patienten auf. Aufgrund der geringen Spezifität könnte dies jedoch eine Überbehandlung bedingen. Durch Pfad A (Hauttest) bzw. Pfad C (ESAT-6/CFP-10) wurden mit 17 bzw. 21 zwar ähnlich viele Individuen identifiziert, jedoch nur 12 Patienten wurden durch beide Algorithmen erfasst. Bei diesen Patienten ist von einer latenten Infektion auszugehen. Es stellt sich nun die Frage, wie die Ergebnisse der verbleibenden Individuen zu werten sind und bei welchen dieser Patienten tatsächlich Maßnahmen zur medikamentösen Prophylaxe ergriffen werden sollten. Die neun nur durch ESAT-6/CFP-10 (Pfad C) erkannten Individuen zählen vermutlich ebenfalls zur Gruppe der latent infizierten Individuen. Bei diesen Personen erwies sich der Hauttest offensichtlich als nicht ausreichend empfindlich. Demgegenüber zählen die nur durch den Hauttest (Pfad A) erkannten fünf Individuen vermutlich zu der Gruppe der BCG-Geimpften. Hier müssen zukünftig weitere prospektive Studien durchgeführt werden, um den prädiktiven Wert der IGRA zur Entwicklung einer Tuberkulose bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen vorherzusagen.

Im Rahmen unserer Untersuchung wurde für die Entscheidung zur Durchführung einer INH-Prophylaxe, welche nur bei den Personen mit gewünschter Behandlung mit TNF $\alpha$ -Blockern nötig war, das auf dem Hauttest basierende konservative Standardverfahren (Pfad A) herangezogen (FURST et al., 2006). Bei einem von neun Patienten mit INH-Prophylaxe entwickelte sich unter der Medikation eine toxische Hepatitis. Jedoch ebenso gravierend ist das Risiko, mutmaßlich nicht infizierte Patienten ohne vorherige INH-Prophylaxe mit TNF $\alpha$ -Blockern zu behandeln und damit die Entwicklung einer aktiven Tuberkulose in Kauf zu nehmen. Von den 60% mit TNF $\alpha$ -Blockern behandelten Patienten hätten unter Verwendung der Reaktivität gegen ESAT-6/ CFP-10 (Pfad C) sechs mit INH prämediziert werden müssen.

Es stellt sich nun die Frage, wie das Screening nach latenter Tuberkulose bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen aussehen könnte (SOLOVIC et al., 2010). Internationale Leitlinien von 2003 bis 2010 geben Empfehlungen hinsichtlich der Diagnostik der LTBI, aber auch der präventiven INH-Therapie und des zeitlichen Abstandes vor Beginn einer Therapie

mit TNF $\alpha$ -Inhibitoren. Inhaltlich wurde allseits neben einer genauen Anamnese-Erhebung die Durchführung einer Röntgenuntersuchung des Thorax empfohlen und die damit verbundene Strahlenbelastung in Kauf genommen. Gemäß den Empfehlungen der Richtlinien aus Irland 2008 (KAVANAGH et al., 2008), Großbritannien 2005 (BTS, 2005), Portugal 2005 (FONSECA et al., 2006), USA 2004 (CDC, 2004), Frankreich 2003 (MARIETTE, SALMON, 2003) und Spanien 2008 (CARMONA et al., 2005) sollte das Screening zusätzlich durch einen Tuberkulin Hauttest ergänzt werden, wobei hier je nach Immunitätsstatus und Impfstatus unterschiedliche Grenzwerte der Indurationen für ein positives Ergebnis festgesetzt wurden. Nach den Richtlinien der Schweiz 2007 (BEGLINGER et al., 2007) und Deutschland 2009 (BEGLINGER et al., 2007; DIEHL et al., 2009) sollte der Intrakutantest nur nach negativer Impfanamnese durchgeführt und anderenfalls ein IGRA als Diagnostikum eingesetzt werden. Letzteres dürfte bei Verfügbarkeit gemäß der Leitlinien von Portugal und Irland auch zusätzlich durchgeführt werden (FONSECA et al., 2006; KAVANAGH et al., 2008). Bei signifikanter Exposition oder unbehandelter Tuberkulose in der Vorgeschichte ist dann je nach Leitlinie eine INH-Prophylaxe von 6 bis 9 Monaten ggf. ersatzweise oder ergänzend mit Rifampicin zu verabreichen. Bei positiven Hauttest-Befunden bzw. positiven IGRA (je nach Leitlinie) oder Tuberkulose-verdächtigen Röntgenbefunden mit einhergehender Risikokonstellation sollte ebenfalls eine präventive Therapie durchgeführt werden. Dabei bleibt unklar, ob die Röntgenuntersuchung einen wirklichen Nutzen zur Diagnosestellung der latenten Infektion oder eine Absicherungsmaßnahme darstellt (MARTIN et al., 2010). Eine schrittweise Annäherung der Leitlinien wäre wünschenswert und wurde bereits in dem TBNET Konsensus Statement 2010 realisiert (SOLOVIC et al., 2010).

Neben der geringen Sensitivität und Spezifität des Hauttestes bei immunkompromittierten Personen ist die Injektion insbesondere bei durch Kortikosteroide verursachten dermalen Atrophien kontraindiziert. Bei einem unserer Patienten entwickelte sich trotz fehlender Anamnese und normalen Röntgenbefundes eine zentrale behandlungsbedürftige Nekrose im Bereich der Induration. Der Hauttest birgt also auch Risiken, während die Durchführung eines IGRA im Gegensatz dazu nur eine einzelne Blutentnahme und auch keinen erneuten Termin (zum Ausmessen der Induration) erfordert. Darüberhinaus ist die Praktikabilität der IGRA insbesondere im ambulanten Bereich besser (SESTER et al., 2006). Dabei wird angenommen, dass eine hier gemessene spezifische Reaktivität als indirektes Maß für die im Körper erhaltene Erregerlast gilt (MILLINGTON et al., 2007). Aber kann bei einer immunologischen Reaktion – obgleich sie erregerspezifisch sein mag – auch von der Persistenz teilungsfähiger

Bakterien im Körper ausgegangen werden? Eine anhaltende Immunantwort wäre sicher je nach Abstand des Kontaktes mit *M. tuberculosis* auch noch Jahre nach Kontakt möglich, ohne dass die Gefahr einer Reaktivierung bestünde (YOUNG et al., 2009). Damit wäre die Spezifität von IGRA – wie auch des Hauttestes – zum Nachweis einer echten latenten Infektion doch niedriger. Um dies beurteilen zu können, wäre es hilfreich, in breit angelegten Studien im Verlauf die Anzahl der Patienten systematisch zu detektieren, welche tatsächlich eine aktive Tuberkulose entwickeln. Hier wäre eine Korrelation mit dem Hauttest- bzw. IGRA-Reaktivitätsmuster und mit dem Typ des verabreichten TNF $\alpha$ -Inhibitors interessant. Auch die Art der rheumatologischen Erkrankung könnte bei einer latenten Infektion mit einem unterschiedlich hohen Reaktivierungsrisiko einhergehen und sollte in künftigen Studien untersucht werden.

### **5.5 Abgrenzung einer aktiven Tuberkulose von einer stattgehabten Infektion**

In der klinischen Diagnostik von Tuberkulose-Infektionen muss rasch unterschieden werden, in welchem Stadium sich die Erkrankung befindet, ob also eine immunologisch frische Erkrankung oder eine ältere Infektion vorliegt. Ebenso wird künftig der Fokus darauf liegen, die Reaktivierung einer latenten Tuberkulose-Infektion frühzeitig detektieren zu können. Da insbesondere bei der aktiven Erkrankung der mikroskopische Nachweis säurefester Stäbchen oft problematisch ist oder ein Erregernachweis erst nach wochenlanger Kultur oder auch gar nicht gelingt, stellt die aktive Tuberkulose die Medizin bei unklaren Befunden vor diagnostische und therapeutische Schwierigkeiten.

Eine aktuelle Metaanalyse verdeutlicht, dass IFN $\gamma$ -basierte Verfahren nicht in der Lage sind, eine aktive Tuberkulose mit ausreichender Sensitivität und Spezifität zu diagnostizieren (SESTER et al., 2011a). Im letzten Teil dieser Arbeit versuchten wir daher, aktive von länger zurückliegenden Tuberkulose-Erkrankungen anhand funktioneller Eigenschaften spezifischer T-Zellen zu unterscheiden. Eine klare Abgrenzung könnte bei unklaren Befunden wie röntgenologischen Rundherden, unklarer B-Symptomatik oder Auftreten von Hämoptoen einen großen Fortschritt für diagnostische und therapeutische Maßnahmen darstellen. Häufig sind solche Befunde schwer interpretierbar: Wenn kein Keimnachweis gelingt und eine aktive Tuberkulose als Erstinfektion oder Reaktivierung nur zu vermuten ist, müssen auch Malignome und Systemerkrankungen differentialdiagnostisch abgegrenzt werden.

Bei Anwendung des IFN $\gamma$ -basierten durchflusszytometrischen Assays zeigte sich, dass fast alle Patienten mit aktiver Tuberkulose und 82,1% der Patienten mit erfolgreich behandelter Tuberkulose PPD reaktive CD4-T-Zellen aufwiesen (4.4.1, Tab. 15). Reaktivität gegen die *M.*

*tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und/oder CFP-10 zeigten lediglich 66,7% versus 57,1% der Patienten. Dies verdeutlicht, dass die Sensitivität für die Detektion einer aktiven Tuberkulose zwar besser ist als für die einer abgelaufenen Infektion, dass jedoch nicht alle Personen erkannt werden. Die beste Sensitivität – bei zu erwartender geringerer Spezifität – ergab sich bei Verwendung des PPD. Durch die Kombination mit ESAT-6 und CFP-10 sollte sich die Spezifität zwar erhöhen lassen, es ist jedoch bekannt, dass schwere Krankheitsverläufe der Tuberkulose nicht selten mit einer verminderten allgemeinen IFN $\gamma$ -Produktion (DLUGOVITZKY et al., 1997; SODHI et al., 1997; HASAN et al., 2009b) oder Abnahme der spezifischen Reaktivität einhergehen (HASAN et al., 2009a). So konnten beispielsweise Chen et al. 2009 diesen Sachverhalt am Beispiel der tuberkulösen Meningitis durch einen hausinternen ELISPOT und den QuantiFERON Test verdeutlichen (CHEN et al., 2009). Vermutlich fußt diese Reaktivitätsabnahme auf einer unspezifischen Suppression des zellulären Immunsystems bei schwerer Erkrankung (HIRSCH et al., 1999). Eine verminderte Reaktivität auf ESAT-6 mittels IFN $\gamma$ -ELISPOT wurde auch bei den Patienten mit schwerer Lungentuberkulose und positiver Kultur im Gegensatz zu Patienten mit negativer Kultur oder einer auf Lymphknoten begrenzten Erkrankung nachgewiesen (PATHAN et al., 2001). Zudem wirkt sich eine veränderte Kompartimentierung beispielsweise durch Zellmigration vom Blut in die Lunge auf eine Detektion von IFN $\gamma$  aus (JAFARI et al., 2009; JAFARI et al., 2011).

Bei pharmakotherapeutisch behandelten Patienten wiesen verschiedene Studien eine intra- und posttherapeutische Abnahme der mittels IFN $\gamma$  in IGRA detektierten T-Zell-Reaktivität nach. Dies gilt sowohl für die Reaktivität gegen ESAT-6 und CFP-10 (AIKEN et al., 2006; GOLETTI et al., 2008; ZHANG et al., 2010) als auch in etwas schwächerem Umfang gegen PPD (AIKEN et al., 2006). Ewer et al. verzeichneten 2006 einen Abfall der ELISPOT-detektierten IFN $\gamma$ -Antworten um bis zu 68% in einem Jahr unter Therapie bei mittels Hauttest positiv getesteten Studenten; teilweise ließ sich auch keine RD1-spezifische Reaktivität mehr nachweisen (EWER et al., 2006). Bei der Behandlung von latenten Infektionen wurde nach einem kurzen Anstieg ebenfalls ein Abfall der spezifischen Reaktivität unter Medikation von Isoniazid beobachtet (WILKINSON et al., 2006). Somit ließe sich spekulieren, dass die Reaktivität für alle drei Antigene bei unseren erfolgreich behandelten Probanden auch aufgrund der durchschnittlich 35 Jahre zurückliegenden Infektion gesunken sei. Teilweise sank die Reaktivität insbesondere gegen ESAT-6 bzw. CFP-10 sogar unter unsere Nachweisgrenze, so dass keine für *M. tuberculosis* spezifische zelluläre Immunität mehr nachgewiesen werden konnte. Die Hypothese einer kontinuierlichen Abnahme in der

spezifischen Immunität bei erfolgreich behandelten Patienten wird durch unsere Beobachtung gestützt (4.4.1, Abb. 17), dass deren Frequenzen PPD-reaktiver CD4-T-Zellen signifikant tiefer lagen (Median 0,33%) als bei denjenigen mit aktiver Tuberkulose (Median 0,71%). Eine sichere individuelle Zuordnung zu einer der beiden Gruppen gelang jedoch aufgrund der erheblichen Überschneidungen nicht. Somit erlaubt die Analyse von IFN $\gamma$  alleine keine ausreichende Unterscheidung zwischen Patienten mit aktiver und nicht-aktiver Tuberkulose.

So mussten andere Kriterien erarbeitet werden, anhand derer eine aktive Tuberkulose spezifischer identifiziert werden kann. Tesfa et al. 2004 und Sargentini et al. 2009 bestimmten neben IFN $\gamma$  auch andere Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2) auf den reaktiven *M. tuberculosis* spezifischen CD4-T-Zellen (TESFA et al., 2004; SARGENTINI et al., 2009); Millington et al. zeigten 2007, dass je nach Erkrankungsstadium unter den reaktiven CD4-T-Zellen verschiedene Subpopulationen zu finden sind (MILLINGTON et al., 2007). Für chronisch virale Infektionen wurde bereits zuvor eine Korrelation der im Körper messbaren Erregerlast mit dem Zytokinprofil Antigen-reaktiver T-Zellen beschrieben (PANTALEO, HARARI, 2006; SESTER et al., 2008). Zur Charakterisierung des Zytokinprofils *M. tuberculosis* spezifischer T-Zellen führten wir eine durchflusszytometrische Charakterisierung des Expressionsmusters der beiden Zytokine IFN $\gamma$  und IL-2 nach spezifischer Stimulation mit PPD durch. Bei der qualitativen Untersuchung der Zytokinexpression der reaktiven Zellen konnten verschiedene Populationen charakterisiert werden: Zellen mit alleiniger Expression von IFN $\gamma$  (Effektor-Zellen) kamen überwiegend in Patienten mit aktiver Erkrankung vor, die Zellen mit Expression von sowohl IFN $\gamma$  als auch IL-2 (zentrale Gedächtniszellen) überwiegend in Patienten mit behandelter Tuberkulose. Durch ROC-Analyse wurde ermittelt, dass ein Anteil <56% der doppelt positiven Zellen unter allen reaktiven CD4-T-Zellen für das Vorliegen einer aktiven Tuberkulose spricht. Hierbei lag die Spezifität bei 100% und die Sensitivität bei 70%. Die verhältnismäßig geringe Sensitivität ist dadurch begründet, dass unter den Patienten mit aktiver Tuberkulose auch 6 Fälle mit einem Anteil >56% der doppelt positiven Zellen zu finden waren, welche sich nicht radiologisch oder mikrobiologisch von den anderen Patienten unterschieden. Interessanterweise fand sich jedoch bei vier Patienten eine extrapulmonale Manifestation (je einmal Haut, Pleura, Knochen und Lymphknoten) und bei zweien eine mit hoher Erregerlast einhergehende bilaterale Sputum-positive Lungentuberkulose. Die hohe Spezifität zeigt jedoch, dass bei einem Anteil <56% an IFN $\gamma$ -IL-2 doppelt positiven ein immunologisch aktives Geschehen äußerst wahrscheinlich ist. Die Charakterisierung des Zytokinprofils liefert folglich wertvolle diagnostische Hinweise zur Unterscheidung einer aktiven von einer nicht-aktiven Infektion. Zur genaueren Evaluation

bedarf es hierbei jedoch noch einiger Längsschnittstudien, welche die Verschiebung des Zytokinprofils unter Behandlung (oder auch Reaktivierung) untersuchen und feststellen, wann und in welchem Ausmaß es zu der Zytokinverschiebung kommt.

Die einzelnen Stadien einer Tuberkulose sind nicht klar immunologisch abgrenzbar. Vielmehr ist der Prozess der Gesundung oder ggf. auch der Reaktivierung als ein immunologisches Kontinuum zu verstehen, wobei unklar ist, wo sich darin die latente Tuberkulose-Infektion anordnen lässt. Es scheint so, als ob man mit dem klinisch definierten Begriff der Erregerabwesenheit sowohl diese Individuen erfasst, die den Erreger erfolgreich eliminiert haben, als auch solche, die klinisch stumm weiterhin infiziert sind (BARRY et al., 2009; YOUNG et al., 2009).

In unseren Untersuchungen zeigten latent infizierte Probanden ein ähnliches Zytokinprofil wie Patienten mit erfolgreich behandelter Tuberkulose, so dass polyfunktionale IFN $\gamma$ /IL-2 doppelt-positive Zellen ein Charakteristikum nicht-aktiver Stadien zu sein scheint (Daten nicht gezeigt bzw. (SESTER et al., 2011b), In ähnlicher Weise konnte in einem ELISA-basierten Verfahren anhand der IFN $\gamma$ -Sekretion alleine nicht sicher auf eine aktive Erkrankung oder latente Infektion geschlossen werden. Jedoch war bei latent infizierten Individuen der Anteil an exprimiertem IL-2 unter den reaktiven Zellen sowohl nach PPD-Stimulation und durchflusszytometrischer Messung als auch nach *M. tuberculosis* spezifischer Stimulation im QFT-GIT und Detektion mittels ELISA signifikant höher (BISELLI et al., 2009; SARGENTINI et al., 2009). Folglich stellt IL-2 einen wertvollen Marker zur Abgrenzung der latenten Infektion dar. Alternativ können mittels Multiplex Assays durch Messen löslicher Chemokine und Zytokine aus Überständen schrittweise Biosignaturen entwickelt werden, um Patienten mit Lungentuberkulose, pleuraler Tuberkulose und sonstigen Pleuraergüssen gegeneinander abzugrenzen (DJOBA SIAWAYA et al., 2009). Eine Assoziation polyfunktionaler T-Zellen mit erfolgreicher Erregerkontrolle konnte kürzlich durch simultane durchflusszytometrische Untersuchung der Zytokine TNF $\alpha$ , IL-2 und IFN $\gamma$  gezeigt werden. In dieser Studie zeigten Patienten mit aktiver Tuberkulose eine Akkumulation von Zellen mit alleiniger Expression von TNF $\alpha$  (HARARI et al., 2011). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass durch die simultane Messung mehrerer Zytokine eine immunbasierte Unterscheidung zwischen aktiver und nicht-aktiver Tuberkulose möglich ist.

Eine andere Möglichkeit bei Verdacht auf eine aktive Tuberkulose-Infektion bei häufig fehlendem Keimnachweis besteht darin, *M. tuberculosis* reaktive Zellen aus verschiedenen Körperflüssigkeiten zu detektieren. Dabei nimmt man an, dass die Erregerlast in dem von der

Tuberkulose befallenen Organ oder Kompartiment höher sein müsste als im peripheren Blut. So zeigten Patienten mit Kultur-positiver tuberkulöser Pleuritis reaktive Zellen auf ESAT-6 in durchschnittlich 15fach erhöhter Konzentration in Pleuraflüssigkeit im Vergleich zum Blut. Demgegenüber waren bei Patienten mit nicht-tuberkulösen Pleuritiden keine reaktiven Zellen in der Pleuraflüssigkeit nachzuweisen (WILKINSON et al., 2005). In ähnlicher Weise reicherten sich *M. tuberculosis*-spezifische T-Zellen auch in erhöhtem Maße in der bronchoalveolären Lavage (BAL) an, was die Diagnose einer intrapulmonalen Tuberkulose untermauern konnte (JAFARI et al., 2006; JAFARI et al., 2009). Die Diagnose einer tuberkulösen Meningitis und die Abgrenzung zu anderen bakteriellen Meningitiden sind häufig durch fehlenden Keimnachweis oder mangelnde DNA-Amplifikation erschwert. Der Nachweis von *M. tuberculosis* reaktiven Zellen im Liquor kann auch hier die Diagnostik bereichern, obgleich aufgrund der im Nervenwasser meist geringer vorliegenden Zellzahlen die Reaktivität im ELISPOT zwar deutlich, aber eher niedriger ausfallen dürfte (KIM et al., 2008; THOMAS et al., 2008). Sofern die Erkrankung mit einer vermehrten abdominellen Flüssigkeitsbildung verbunden ist, können aus dem Aszites reaktive Zellen bestimmt werden (WILKINSON et al., 2005; KIM et al., 2009b), auch wenn hier verschiedene Organe (Peritoneum, Nieren, abdominelle Lymphknoten, Leber, Pankreas u.a.) von der Tuberkulose befallen sein können. Bei diesen Studien wurden fast immer ELISPOT-Assays zum Nachweis der Reaktivität benutzt. Uns selbst gelang es ebenfalls, bei einer kleinen Fallzahl von Patienten reaktive Zellen aus einer BAL oder einem Pleuraerguss durchflusszytometrisch zu detektieren (Daten nicht gezeigt), so dass auch die Durchflusszytometrie zur Analyse dieser Kompartimente herangezogen werden könnte.

Im Vergleich zur Untersuchung von Nicht-Blut Kompartimenten stellt die Bestimmung des Zytokinprofils aus *M. tuberculosis*-spezifischen T-Zellen aus dem Vollblut eine logistisch einfachere Methode dar, bei der ein invasiverer Eingriff (Bronchoskopie, Liquor-, Pleura- oder Peritonealpunktion) nicht notwendig ist. Zudem kann die Zellzahl in der Flüssigkeit für eine Stimulation zu niedrig sein. Die Analyse aus Nicht-Blut Kompartimenten sollte stets mit dem Nachweis einer zellulären Immunität im peripheren Blut gekoppelt werden, da quantitative Unterschiede in den beiden Kompartimenten am besten mit einem aktiven Geschehen korrelieren dürften.

## **5.6 Zusammenfassung und Ausblick**

In dieser Arbeit gelang es, eine rasch durchzuführende Kurzzeitstimulation von im Blut befindlichen Lymphozyten zu realisieren und den Anteil der auf spezifische Antigene

reaktiven CD4-T-Zellen durchflusszytometrisch zu detektieren. Dabei konnte durch die Verwendung von Tuberkulin als Antigen eine im Vergleich zum etablierten Hauttest nach Mendel-Mantoux erhöhte Sensitivität und Praktikabilität erreicht werden. Der Einsatz der *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 eröffnete in der immunologischen Diagnostik von tuberkulösen Infektionen ungeahnte neue Möglichkeiten zur verbesserten Diagnostik der latenten Infektion. So konnten dadurch BCG-Immunisierung und die meisten anderen mykobakteriellen Infektionen ausgeschlossen werden, was eine Erhöhung der Spezifität mit sich brachte. Neben den kommerziell verfügbaren ELISPOT- und ELISA-basierten Systemen stellt die Durchflusszytometrie ein vollwertiges Testverfahren dar und beinhaltet die Möglichkeit, reaktive Zellen quantitativ und qualitativ zu charakterisieren. Die meisten Formen der moderaten Immundefizienz stellen für die Durchflusszytometrie kein relevantes Problem dar, um eine zelluläre Immunität auf dem Boden einer latenten, abgelaufenen oder aktiven Infektion detektieren zu können. Außerdem zeigt die Durchflusszytometrie als eines der ersten Verfahren die Möglichkeit auf, rasch und unkompliziert eine aktive Tuberkulose von einem nicht aktiven Geschehen zu unterscheiden. Wenngleich die *in vitro* Verfahren eine Bereicherung des diagnostischen Spektrums darstellen, bergen sie auch gleichzeitig die Gefahr einer unkritischen Anwendung. Somit müssen die Anwendung der Durchflusszytometrie und die Beurteilung der Ergebnisse immer den klinisch-diagnostischen Kontext berücksichtigen.

Es ist zu erwarten, dass sich die Diagnostik von Tuberkulose-Infektionen erheblich wandeln und der Hauttest nach Mendel-Mantoux allmählich durch die *in vitro* Verfahren abgelöst werden wird. Neben der eingeschränkten Sensitivität und Spezifität weist der Hauttest einige Nachteile wie Schwierigkeiten bei der Injektion, Anwendung bei dermalen Atrophien oder überschießende immunologische Reaktionen mit Nekrosenbildung auf. Auch bei vorheriger BCG-Immunisierung kann ein positives Ergebnis nicht sicher als pathologisch eingestuft werden. Das Ausmessen der maximalen transversalen Induration erfordert ebenfalls Erfahrung des Untersuchers und wird nicht selten aufgrund mangelnder Kenntnisse nicht korrekt durchgeführt. Zudem muss diese Beurteilung nach 48 bis 72 Stunden erfolgen, was im ambulanten Bereich logistische Schwierigkeiten bereiten kann, da Patienten ein zweites Mal einbestellt werden müssen. Die neuen *in-vitro*-Testsysteme stellen eine einfachere Alternative dar. Weitere Studien sind jedoch notwendig, um den positiven prädiktiven Wert einzelner IGRA im Vergleich zum Hauttest im Setting von Umgebungsuntersuchungen zu ermitteln. Desweiteren muss untersucht werden, welche IGRA eine günstigste Kosten-Nutzen-Korrelation aufweisen.



Im Vergleich zu den ELISPOT oder ELISA-basierten IGRA kann mittels Durchflusszytometrie eine Fülle von Aktivierungsmarkern durch Mehrfachfärbung nachgewiesen werden: Die durchflusszytometrische Phänotypisierung reaktiver Zellen bietet hier vielversprechende Möglichkeiten, um verschiedene Stadien der Latenz und Krankheitsaktivität besser zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang werden auch neuere Antigene evaluiert. Bei zunehmender Inzidenz der Tuberkulose-Fälle weltweit (WHO, 2010a), insbesondere der multiresistenten Stämme, kann die rasche immunologische Diagnostik einen wertvollen Beitrag zur schnellen Identifikation von Risikopatienten leisten, um diese ohne unnötigen Zeitverlust einer adäquaten Prophylaxe oder antituberkulösen Therapie zuzuführen.

## 6 Literatur

1. Adetifa IM, Lugos MD, Hammond A, Jeffries D, Donkor S, Adegbola RA, Hill PC (2007) Comparison of two interferon gamma release assays in the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection and disease in The Gambia. *BMC Infect Dis* 7:122
2. Aiken AM, Hill PC, Fox A, McAdam KP, Jackson-Sillah D, Lugos MD, Donkor SA, Adegbola RA, Brookes RH (2006) Reversion of the ELISPOT test after treatment in Gambian tuberculosis cases. *BMC Infect Dis* 6:66
3. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 356:1099-1104
4. Askling J, Fored CM, Brandt L, Baecklund E, Bertilsson L, Coster L, Geborek P, Jacobsson LT, Lindblad S, Lysholm J, Rantapaa-Dahlqvist S, Saxne T, Romanus V, Klareskog L, Feltelius N (2005) Risk and case characteristics of tuberculosis in rheumatoid arthritis associated with tumor necrosis factor antagonists in Sweden. *Arthritis Rheum* 52:1986-1992
5. ATS (2000). Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. In *Am J Respir Crit Care Med* (American Thoracic Society), pp. 1376-1395
6. ATS (2001). ATS adopts diagnostic standards for tuberculosis. American Thoracic Society. In *Am Fam Physician* (American Thoracic Society), pp. 979-980
7. ATS-CDC (2000). Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. American Thoracic Society. In *MMWR Recomm Rep* (American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention), pp. 1-51
8. Avgustin B, Kotnik V, Skoberne M, Malovrh T, Skralovnik-Stern A, Tercej M (2005) CD69 expression on CD4+ T lymphocytes after in vitro stimulation with tuberculin is an indicator of immune sensitization against Mycobacterium tuberculosis antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 12:101-106
9. Bandera A, Gori A, Catozzi L, Degli Esposti A, Marchetti G, Molteni C, Ferrario G, Codecasa L, Penati V, Matteelli A, Franzetti F (2001) Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 39:2213-2218
10. Barry CE, 3rd, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, Schnappinger D, Wilkinson RJ, Young D (2009) The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol* 7:845-855
11. Beglinger C, Dudler J, Mottet C, Nicod L, Seibold F, Villiger PM, Zellweger JP (2007) Screening for tuberculosis infection before the initiation of an anti-TNF-alpha therapy. *Swiss Med Wkly* 137:620-622
12. Behar SM, Shin DS, Maier A, Coblyn J, Helfgott S, Weinblatt ME (2009) Use of the T-SPOT.TB assay to detect latent tuberculosis infection among rheumatic disease patients on immunosuppressive therapy. *J Rheumatol* 36:546-551
13. Bergamini BM, Losi M, Vaienti F, D'Amico R, Meccugni B, Meacci M, De Giovanni D, Rumpianesi F, Fabbri LM, Balli F, Richeldi L (2009) Performance of commercial blood tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection in children and adolescents. *Pediatrics* 123:e419-424
14. Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B (1998) A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* 144 ( Pt 11):3195-3203
15. Biselli R, Mariotti S, Sargentini V, Sauzullo I, Lastilla M, Mengoni F, Vanini V, Girardi E, Goletti D, R DA, Nisini R (2010) Detection of interleukin-2 in addition to

- interferon-gamma discriminates active tuberculosis patients, latently infected individuals, and controls. *Clin Microbiol Infect* 16(8):1282-1284
16. Bocchino M, Matarese A, Bellofiore B, Giacomelli P, Santoro G, Balato N, Castiglione F, Scarpa R, Perna F, Signoriello G, Galati D, Ponticiello A, Sanduzzi A (2008) Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:907-913
  17. Böcker W, Denk H, Heitz PU (2004). Pathologie. In Elsevier, pp. 103-107, 1151-1155.
  18. Brassard P, Lowe AM, Bernatsky S, Kezouh A, Suissa S (2009) Rheumatoid arthritis, its treatments, and the risk of tuberculosis in Quebec, Canada. *Arthritis Rheum* 61:300-304
  19. Brock I, Weldingh K, Leyten EM, Arend SM, Ravn P, Andersen P (2004) Specific T-cell epitopes for immunoassay-based diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol* 42:2379-2387
  20. Brodhun B, Altmann D, Haas W (2010). Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2008 (Robert-Koch-Institut), pp. 1-97
  21. Bruns H, Meinken C, Schauenberg P, Harter G, Kern P, Modlin RL, Antoni C, Stenger S (2009) Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *J Clin Invest* 119:1167-1177
  22. BTS (2005) BTS recommendations for assessing risk and for managing *Mycobacterium tuberculosis* infection and disease in patients due to start anti-TNF-alpha treatment. *Thorax* 60:800-805
  23. Carmona L, Gomez-Reino JJ, Rodriguez-Valverde V, Montero D, Pascual-Gomez E, Mola EM, Carreno L, Figueroa M (2005) Effectiveness of recommendations to prevent reactivation of latent tuberculosis infection in patients treated with tumor necrosis factor antagonists. *Arthritis Rheum* 52:1766-1772
  24. Casas I, Latorre I, Esteve M, Ruiz-Manzano J, Rodriguez D, Prat C, Garcia-Olive I, Lacoma A, Ausina V, Dominguez J (2009) Evaluation of interferon-gamma release assays in the diagnosis of recent tuberculosis infection in health care workers. *PLoS One* 4:e6686
  25. Cattamanchi A, Ssewenyana I, Davis JL, Huang L, Worodria W, den Boon S, Yoo S, Andama A, Hopewell PC, Cao H (2010) Role of interferon-gamma release assays in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients with advanced HIV infection. *BMC Infect Dis* 10:75
  26. CDC (2004). Tuberculosis associated with blocking agents against tumor necrosis factor-alpha--California, 2002-2003. In *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* (Centers for Disease Control and Prevention), pp. 683-686
  27. Chen X, Yang Q, Zhang M, Graner M, Zhu X, Larmonier N, Liao M, Yu W, Deng Q, Zhou B (2009) Diagnosis of active tuberculosis in China using an in-house gamma interferon enzyme-linked immunospot assay. *Clin Vaccine Immunol* 16:879-884
  28. Chou CH, Hsu HL, Lee LN, Hsueh PR, Luh KT (2009) Comparison of 2 interferon-gamma assays and Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay for rapid diagnosis of tuberculosis among patients with suspected tuberculosis in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 42:251-257
  29. Cobanoglu N, Ozcelik U, Kalyoncu U, Ozen S, Kiraz S, Gurcan N, Kaplan M, Dogru D, Yalcin E, Pekcan S, Kose M, Topaloglu R, Besbas N, Bakkaloglu A, Kiper N (2007) Interferon-gamma assays for the diagnosis of tuberculosis infection before using tumour necrosis factor-alpha blockers. *Int J Tuberc Lung Dis* 11:1177-1182
  30. Cobelens FG, Egwaga SM, van Ginkel T, Muwinge H, Matee MI, Borgdorff MW (2006) Tuberculin skin testing in patients with HIV infection: limited benefit of reduced cutoff values. *Clin Infect Dis* 43:634-639

31. Comstock GW (1975) False tuberculin test results. *Chest* 68:465-469
32. Connell TG, Ritz N, Paxton GA, Buttery JP, Curtis N, Ranganathan SC (2008) A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS One* 3:e2624
33. Cosmi L, Maggi E, Santarlasci V, Liotta F, Frosali F, Angeli R, Mazzetti M, Vultaggio A, Matucci A, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F (2007) Detection by flow cytometry of ESAT-6- and PPD-specific circulating CD4+ T lymphocytes as a diagnostic tool for tuberculosis. *Int Arch Allergy Immunol* 143:1-9
34. Daniel TM (2006) The history of tuberculosis. *Respir Med* 100:1862-1870
35. Daniel TM, Janicki BW (1978) Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties. *Microbiol Rev* 42:84-113
36. de Jong BC, Adetifa I, Walther B, Hill PC, Antonio M, Ota M, Adegbola RA (2009a) Differences between tuberculosis cases infected with *Mycobacterium africanum*, West African type 2, relative to Euro-American *Mycobacterium tuberculosis*: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol* 58:102-105
37. de Jong E, Rentenaar RJ, van Pelt R, de Lange W, Schreurs W, van Soolingen D, Sturm PD (2009b) Two cases of *Mycobacterium microti*-induced culture-negative tuberculosis. *J Clin Microbiol* 47:3038-3040
38. del Rio Camacho G, Perea-Milla E, Romero Gonzalez J, Perez Frias J (2009) Interpretation of a serial Mantoux test taking into account the annual risk of tuberculous infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 13:196-200
39. den Boon S, White NW, van Lill SW, Borgdorff MW, Verver S, Lombard CJ, Bateman ED, Irusen E, Enarson DA, Beyers N (2006) An evaluation of symptom and chest radiographic screening in tuberculosis prevalence surveys. *Int J Tuberc Lung Dis* 10:876-882
40. Detjen AK, Keil T, Roll S, Hauer B, Mauch H, Wahn U, Magdorf K (2007) Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 45:322-328
41. Diel R, Hauer B, Loddenkemper R, Manger B, Kruger K (2009) Recommendations for tuberculosis screening before initiation of TNF-alpha-inhibitor treatment in rheumatic diseases. *Z Rheumatol* 68:411-416
42. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A (2010) Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. *Chest* 137:952-968
43. Dixon WG, Hyrich KL, Watson KD, Lunt M, Galloway J, Ustianowski A, Symmons DP (2010) Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR). *Ann Rheum Dis* 69:522-528
44. Djoba Siawaya JF, Chegou NN, van den Heuvel MM, Diacon AH, Beyers N, van Helden P, Walzl G (2009) Differential cytokine/chemokines and KL-6 profiles in patients with different forms of tuberculosis. *Cytokine* 47:132-136
45. Dlugovitzky D, Torres-Morales A, Rateni L, Farroni MA, Largacha C, Molteni O, Bottasso O (1997) Circulating profile of Th1 and Th2 cytokines in tuberculosis patients with different degrees of pulmonary involvement. *FEMS Immunol Med Microbiol* 18:203-207
46. Dobler CC, Marks GB, Simpson SE, Crawford AB (2008) Recurrence of tuberculosis at a Sydney chest clinic between 1994 and 2006: reactivation or reinfection? *Med J Aust* 188:153-155
47. Dominguez J, Ruiz-Manzano J, De Souza-Galvao M, Latorre I, Mila C, Blanco S, Jimenez MA, Prat C, Lacoma A, Altet N, Ausina V (2008) Comparison of two

- commercially available gamma interferon blood tests for immunodiagnosis of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 15:168-171
48. Eker B, Ortmann J, Migliori GB, Sotgiu G, Muetterlein R, Centis R, Hoffmann H, Kirsten D, Schaberg T, Ruesch-Gerdes S, Lange C (2008) Multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis, Germany. *Emerg Infect Dis* 14:1700-1706
  49. Erkens CG, Kamphorst M, Abubakar I, Bothamley GH, Chemtob D, Haas W, Migliori GB, Rieder HL, Zellweger JP, Lange C (2010) Tuberculosis contact investigation in low prevalence countries: a European consensus. *Eur Respir J* 36:925-949
  50. Eum SY, Lee YJ, Kwak HK, Min JH, Hwang SH, Via LE, Barry CE, 3rd, Cho SN (2008) Evaluation of the diagnostic utility of a whole-blood interferon-gamma assay for determining the risk of exposure to *Mycobacterium tuberculosis* in Bacille Calmette-Guerin (BCG)-vaccinated individuals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 61:181-186
  51. Ewer K, Millington KA, Deeks JJ, Alvarez L, Bryant G, Lalvani A (2006) Dynamic antigen-specific T-cell responses after point-source exposure to *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 174:831-839
  52. Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D (2006) False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis* 10:1192-1204
  53. Ferrara G, Losi M, D'Amico R, Roversi P, Piro R, Meacci M, Meccugni B, Dori IM, Andreani A, Bergamini BM, Mussini C, Rumpianesi F, Fabbri LM, Richeldi L (2006) Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *Lancet* 367:1328-1334
  54. Fine P, Carneiro I, Milstien J, Clements C (1999). Issues relating to the use of BCG in immunization programmes: A discussion dokument (World Health Organization), pp. 45
  55. Fonseca JE, Canhao H, Silva C, Miguel C, Mediavilla MJ, Teixeira A, Castelao W, Nero P, Bernardes M, Bernardo A, Mariz E, Godinho F, Santos MJ, Bogas M, Oliveira M, Saavedra MJ, Barcelos A, Cruz M, Santos RA, Mauricio L, Rodrigues M, Figueiredo G, Quintal A, Patto JV, Malcata A, da Silva JC, Araujo D, Ventura F, Branco J, Queiroz MV (2006) Tuberculosis in rheumatic patients treated with tumour necrosis factor alpha antagonists: the Portuguese experience. *Acta Reumatol Port* 31:247-253
  56. Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Burmester GR, Emery P, Keystone EC, Schiff MH, van Riel PL, Weinblatt ME, Weisman MH (2006) Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases, 2006. *Ann Rheum Dis* 65 Suppl 3:iii2-15
  57. Gibbons LJ, Hyrich KL (2009) Biologic therapy for rheumatoid arthritis: clinical efficacy and predictors of response. *BioDrugs* 23:111-124
  58. Goerke H (2000). *Arzt und Heilkunde: 3000 Jahre Medizin*. In RM Buch und Medien Vertrieb GmbH, pp. 69-73.
  59. Goldblatt F, Isenberg DA (2005) New therapies for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 140:195-204
  60. Goletti D, Carrara S, Mayanja-Kizza H, Baseke J, Mugerwa MA, Girardi E, Toossi Z (2008) Response to *M. tuberculosis* selected RD1 peptides in Ugandan HIV-infected patients with smear positive pulmonary tuberculosis: a pilot study. *BMC Infect Dis* 8:11
  61. Haas W, Brodhun B (2006). *Tuberkulose*. In Robert-Koch-Institut
  62. Hansted E, Andriuskeviciene A, Sakalauskas R, Kevalas R, Sitkauskiene B (2009) T-cell-based diagnosis of tuberculosis infection in children in Lithuania: a country of high incidence despite a high coverage with bacille Calmette-Guerin vaccination. *BMC Pulm Med* 9:41
  63. Harari A, Rozot V, Enders FB, Perreau M, Stalder JM, Nicod LP, Cavassini M,

- Calandra T, Blanchet CL, Jatou K, Faouzi M, Day CL, Hanekom WA, Bart PA, Pantaleo G (2011) Dominant TNF-alpha+ Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. *Nat Med* 17:372-376
64. Harboe M (1981) Antigens of PPD, old tuberculin, and autoclaved Mycobacterium bovis BCG studied by crossed immunoelectrophoresis. *Am Rev Respir Dis* 124:80-87
  65. Hasan Z, Jamil B, Ashraf M, Islam M, Yusuf MS, Khan JA, Hussain R (2009a) ESAT6-induced IFN-gamma and CXCL9 can differentiate severity of tuberculosis. *PLoS One* 4:e5158
  66. Hasan Z, Jamil B, Khan J, Ali R, Khan MA, Nasir N, Yusuf MS, Jamil S, Irfan M, Hussain R (2009b) Relationship between circulating levels of IFN-gamma, IL-10, CXCL9 and CCL2 in pulmonary and extrapulmonary tuberculosis is dependent on disease severity. *Scand J Immunol* 69:259-267
  67. Havlir DV, Barnes PF (1999) Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 340:367-373
  68. Hernandez J, Garibay-Escobar A, Mendoza-Mendoza A, Pinelli-Saavedra A, Valenzuela O (2008) Effect of exogenous vitamin E on proliferation and cytokine production in peripheral blood mononuclear cells from patients with tuberculosis. *Br J Nutr* 99:224-229
  69. Herold G (2009). *Innere Medizin* 2010. In Gerd Herold, pp. 393-399.
  70. Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, Johnson JL, Schwander SK, Robertson S, Wallis RS, Edmonds K, Okwera A, Mugerwa R, Peters P, Ellner JJ (1999) Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J Infect Dis* 180:2069-2073
  71. Hlavsa MC, Moonan PK, Cowan LS, Navin TR, Kammerer JS, Morlock GP, Crawford JT, Lobue PA (2008) Human tuberculosis due to Mycobacterium bovis in the United States, 1995-2005. *Clin Infect Dis* 47:168-175
  72. Holden M, Dubin MR, Diamond PH (1971) Frequency of negative intermediate-strength tuberculin sensitivity in patients with active tuberculosis. *N Engl J Med* 285:1506-1509
  73. Horowitz HW, Luciano BB, Kadel JR, Wormser GP (1995) Tuberculin skin test conversion in hospital employees vaccinated with bacille Calmette-Guerin: recent Mycobacterium tuberculosis infection or booster effect? *Am J Infect Control* 23:181-187
  74. Hughes AJ, Hutchinson P, Gooding T, Freezer NJ, Holdsworth SR, Johnson PD (2005) Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection using ESAT-6 and intracellular cytokine cytometry. *Clin Exp Immunol* 142:132-139
  75. Igari H, Watanabe A, Sato T (2007) Booster phenomenon of QuantiFERON-TB Gold after prior intradermal PPD injection. *Int J Tuberc Lung Dis* 11:788-791
  76. Jafari C, Ernst M, Kalsdorf B, Greinert U, Diel R, Kirsten D, Marienfeld K, Lalvani A, Lange C (2006) Rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis by bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot. *Am J Respir Crit Care Med* 174:1048-1054
  77. Jafari C, Kessler P, Sotgiu G, Ernst M, Lange C (2011) Impact of a Mycobacterium tuberculosis-specific interferon-gamma release assay in bronchoalveolar lavage fluid for a rapid diagnosis of tuberculosis. *J Intern Med* 270:254-262
  78. Jafari C, Thijsen S, Sotgiu G, Goletti D, Benitez JA, Losi M, Eberhardt R, Kirsten D, Kalsdorf B, Bossink A, Latorre I, Migliori GB, Strassburg A, Winteroll S, Greinert U, Richeldi L, Ernst M, Lange C (2009) Bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot for a rapid diagnosis of tuberculosis: a Tuberculosis Network European Trialsgroup study. *Am J Respir Crit Care Med* 180:666-673
  79. Janeway C, Travers P (2002). *Immunologie*. In Spektrum Akademischer Verlag, pp.

- 167-169, 358-363, 529-531, 697.
80. Janossy G, Barry SM, Breen RA, Hardy GA, Lipman M, Kern F (2008) The role of flow cytometry in the interferon-gamma-based diagnosis of active tuberculosis and its coinfection with HIV-1--A technically oriented review. *Cytometry B Clin Cytom* 74 Suppl 1:S141-151
  81. Jasmer RM, Bozeman L, Schwartzman K, Cave MD, Saukkonen JJ, Metchock B, Khan A, Burman WJ (2004) Recurrent tuberculosis in the United States and Canada: relapse or reinfection? *Am J Respir Crit Care Med* 170:1360-1366
  82. Jiang W, Shao L, Zhang Y, Zhang S, Meng C, Xu Y, Huang L, Wang Y, Weng X, Zhang W (2009) High-sensitive and rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by IFN-gamma release assay among HIV-infected individuals in BCG-vaccinated area. *BMC Immunol* 10:31
  83. Kang YA, Lee HW, Hwang SS, Um SW, Han SK, Shim YS, Yim JJ (2007) Usefulness of whole-blood interferon-gamma assay and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Chest* 132:959-965
  84. Katikireddi VS, Whittle SL, Hill CL (2010) Tumour necrosis factor inhibitors and risk of serious infection in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* 13:12-26
  85. Kavanagh PM, Gilmartin JJ, O'Donnell J, O'Flanagan D (2008) Tumour necrosis factor-alpha and tuberculosis: guidance from the National TB Advisory Committee. *Ir Med J* 101:6-7
  86. Keane J (2005) TNF-blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old topic. *Rheumatology (Oxford)* 44:714-720
  87. Kim EY, Lim JE, Jung JY, Son JY, Lee KJ, Yoon YW, Park BH, Moon JW, Park MS, Kim YS, Kim SK, Chang J, Kang YA (2009a) Performance of the tuberculin skin test and interferon-gamma release assay for detection of tuberculosis infection in immunocompromised patients in a BCG-vaccinated population. *BMC Infect Dis* 9:207
  88. Kim SH, Cho OH, Park SJ, Ye BD, Sung H, Kim MN, Lee SO, Choi SH, Woo JH, Kim YS (2009b) Diagnosis of abdominal tuberculosis by T-cell-based assays on peripheral blood and peritoneal fluid mononuclear cells. *J Infect* 59:409-415
  89. Kim SH, Chu K, Choi SJ, Song KH, Kim HB, Kim NJ, Park SH, Yoon BW, Oh MD, Choe KW (2008) Diagnosis of central nervous system tuberculosis by T-cell-based assays on peripheral blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells. *Clin Vaccine Immunol* 15:1356-1362
  90. Kleinert S, Kurzai O, Elias J, Marten K, Engelke C, Feuchtenberger M, Sandstede J, Frosch M, Tony HP, Kneitz C (2010) Comparison of two interferon-gamma release assays and tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis in patients with immune-mediated inflammatory diseases. *Ann Rheum Dis* 69:782-784
  91. Kubica T, Rusch-Gerdes S, Niemann S (2003) Mycobacterium bovis subsp. caprae caused one-third of human M. bovis-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *J Clin Microbiol* 41:3070-3077
  92. Lalvani A, Nagvenkar P, Udawadia Z, Pathan AA, Wilkinson KA, Shastri JS, Ewer K, Hill AV, Mehta A, Rodrigues C (2001) Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent Mycobacterium tuberculosis infection in healthy urban Indians. *J Infect Dis* 183:469-477
  93. Lalvani A, Pareek M (2009) Interferon gamma release assays: principles and practice. *Enferm Infec Microbiol Clin*
  94. Leandro MJ (2009) Anti-tumour necrosis factor therapy and B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 11:128
  95. Lee JY, Choi HJ, Park IN, Hong SB, Oh YM, Lim CM, Lee SD, Koh Y, Kim WS, Kim DS, Kim WD, Shim TS (2006) Comparison of two commercial interferon-gamma

- assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur Respir J* 28:24-30
96. Liu XQ, Dosanjh D, Varia H, Ewer K, Cockle P, Pasvol G, Lalvani A (2004) Evaluation of T-cell responses to novel RD1- and RD2-encoded *Mycobacterium tuberculosis* gene products for specific detection of human tuberculosis infection. *Infect Immun* 72:2574-2581
  97. Luetkemeyer AF, Charlebois ED, Flores LL, Bangsberg DR, Deeks SG, Martin JN, Havlir DV (2007) Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 175:737-742
  98. Mancuso JD, Tribble D, Mazurek GH, Li Y, Olsen C, Aronson NE, Geiter L, Goodwin D, Keep LW (2011) Impact of targeted testing for latent tuberculosis infection using commercially available diagnostics. *Clin Infect Dis* 53:234-244
  99. Mantegani P, Piana F, Codecasa L, Galli L, Scarpellini P, Lazzarin A, Cirillo D, Fortis C (2006) Comparison of an in-house and a commercial RD1-based ELISPOT-IFN-gamma assay for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Med Res* 4:266-272
  100. Mariette X, Salmon D (2003) French guidelines for diagnosis and treating latent and active tuberculosis in patients with RA treated with TNF blockers. *Ann Rheum Dis* 62:791
  101. Martin J, Walsh C, Gibbs A, McDonnell T, Fearon U, Keane J, Codd MB, Dodd J, Veale D, Fitzgerald O, Bresnihan B (2010) Comparison of interferon {gamma} release assays and conventional screening tests before tumour necrosis factor {alpha} blockade in patients with inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 69:181-185
  102. Mason DY, Andre P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, de Haas M, Goyert S, Hadam M, Hart D, Horejsi V, Meuer S, Morissey J, Schwartz-Albiez R, Shaw S, Simmons D, Ugucioni M, van der Schoot E, Viver E, Zola H (2001) CD antigens 2001. *Tissue Antigens* 58:425-430
  103. Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K (2010) Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection - United States, 2010. *MMWR Recomm Rep* 59:1-25
  104. Meissner G (1974) Bovine tuberculosis in man before and after the eradication of tuberculosis in cattle (author's transl). *Prax Pneumol* 28:123-128
  105. Miguelez SA, Fernandez JP, Cebrian MT, Garcia JA, Reyes PP, Garcia JM (2009) Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Murcia. *An Pediatr (Barc)* 71:327-330
  106. Millington KA, Innes JA, Hackforth S, Hinks TS, Deeks JJ, Dosanjh DP, Guyot-Revol V, Gunatheesan R, Klenerman P, Lalvani A (2007) Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells and antigen load. *J Immunol* 178:5217-5226
  107. Morales A (1980) Treatment of superficial bladder cancer. *Can Med Assoc J* 122:1133-1138
  108. Mtei L, Matee M, Herfort O, Bakari M, Horsburgh CR, Waddell R, Cole BF, Vuola JM, Tvaroha S, Kreiswirth B, Pallangyo K, von Reyn CF (2005) High rates of clinical and subclinical tuberculosis among HIV-infected ambulatory subjects in Tanzania. *Clin Infect Dis* 40:1500-1507
  109. Mutsvangwa J, Millington KA, Chaka K, Mavhudzi T, Cheung YB, Mason PR, Butterworth AE, Corbett EL, Lalvani A (2010) Identifying recent *Mycobacterium tuberculosis* transmission in the setting of high HIV and TB burden. *Thorax* 65:315-320
  110. Netter FH, Böttcher T (2001) *Netter's Innere Medizin*, Thieme Verlag.
  111. Oni T, Patel J, Gideon HP, Seldon R, Wood K, Hlombe Y, Wilkinson KA, Rangaka MX, Mendelson M, Wilkinson RJ (2010) Enhanced diagnosis of HIV-1 associated tuberculosis by relating T-SPOT.TB and CD4 counts. *Eur Respir J*
  112. Onwubalili JK (1987) Reduced in vitro tuberculin reactivity of lymphocytes from



- patients with tuberculosis. *J Clin Lab Immunol* 24:81-85
113. Pantaleo G, Harari A (2006) Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat Rev Immunol* 6:417-423
  114. Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, McShane H, Davidson RN, Pasvol G, Hill AV, Lalvani A (2001) Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 T cells in Mycobacterium tuberculosis-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. *J Immunol* 167:5217-5225
  115. Ponce de Leon D, Acevedo-Vasquez E, Alvizuri S, Gutierrez C, Cucho M, Alfaro J, Perich R, Sanchez-Torres A, Pastor C, Sanchez-Schwartz C, Medina M, Gamboa R, Ugarte M (2008) Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. *J Rheumatol* 35:776-781
  116. Ponce de Leon D, Acevedo-Vasquez E, Sanchez-Torres A, Cucho M, Alfaro J, Perich R, Pastor C, Harrison J, Sanchez-Schwartz C (2005) Attenuated response to purified protein derivative in patients with rheumatoid arthritis: study in a population with a high prevalence of tuberculosis. *Ann Rheum Dis* 64:1360-1361
  117. RKI (2009). *Epidemiologisches Bulletin* 30/2009. In *Epidemiologisches Bulletin* (Robert-Koch-Institut)
  118. Sagheb MM, Goodarzi M, Roozbeh J (2008) The booster phenomenon of tuberculin skin testing in patients receiving hemodialysis. *Iran J Immunol* 5:212-216
  119. Sargentini V, Mariotti S, Carrara S, Gagliardi MC, Teloni R, Goletti D, Nisini R (2009) Cytometric detection of antigen-specific IFN-gamma/IL-2 secreting cells in the diagnosis of tuberculosis. *BMC Infect Dis* 9:99
  120. Sauzullo I, Massetti AP, Mengoni F, Rossi R, Lichtner M, Ajassa C, Vullo V, Mastroianni CM (2011) Influence of previous tuberculin skin test on serial IFN-gamma release assays. *Tuberculosis (Edinb)* 91:322-326
  121. Schubel N, Rupp J, Gottschalk S, Zabel P, Dalhoff K (2006) Disseminated mycobacterium bovis infection in an immunocompetent host. *Eur J Med Res* 11:163-166
  122. Sellam J, Hamdi H, Roy C, Baron G, Lemann M, Puechal X, Breban M, Berenbaum F, Humbert M, Weldingh K, Salmon D, Ravaud P, Emilie D, Mariette X (2007) Comparison of in vitro-specific blood tests with tuberculin skin test for diagnosis of latent tuberculosis before anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis* 66:1610-1615
  123. Seong SS, Choi CB, Woo JH, Bae KW, Joung CL, Uhm WS, Kim TH, Jun JB, Yoo DH, Lee JT, Bae SC (2007) Incidence of tuberculosis in Korean patients with rheumatoid arthritis (RA): effects of RA itself and of tumor necrosis factor blockers. *J Rheumatol* 34:706-711
  124. Sester M, Gartner BC, Sester U, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, Kohler H (2003) Is the cytomegalovirus serologic status always accurate? A comparative analysis of humoral and cellular immunity. *Transplantation* 76:1229-1230
  125. Sester M, Sester U, Clauer P, Heine G, Mack U, Moll T, Sybrecht GW, Lalvani A, Kohler H (2004) Tuberculin skin testing underestimates a high prevalence of latent tuberculosis infection in hemodialysis patients. *Kidney Int* 65:1826-1834
  126. Sester M, Sester U, Gartner B, Heine G, Girndt M, Mueller-Lantzsch N, Meyerhans A, Kohler H (2001) Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* 71:1287-1294
  127. Sester M, Sester U, Kohler H, Schneider T, Deml L, Wagner R, Mueller-Lantzsch N, Pees HW, Meyerhans A (2000) Rapid whole blood analysis of virus-specific CD4 and CD8 T cell responses in persistent HIV infection. *Aids* 14:2653-2660
  128. Sester M, Sotgiu G, Lange C, Giehl C, Girardi E, Migliori GB, Bossink A, Dheda K,

- Diel R, Dominguez J, Lipman M, Nemeth J, Ravn P, Winkler S, Huitric E, Sandgren A, Manissero D (2011a) Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 37:100-111
129. Sester U, Fousse M, Dirks J, Mack U, Prasse A, Singh M, Lalvani A, Sester M (2011b) Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active states. *PLoS One* 6:e17813
  130. Sester U, Junker H, Hodapp T, Schutz A, Thiele B, Meyerhans A, Kohler H, Sester M (2006) Improved efficiency in detecting cellular immunity towards M. tuberculosis in patients receiving immunosuppressive drug therapy. *Nephrol Dial Transplant* 21:3258-3268
  131. Sester U, Presser D, Dirks J, Gartner BC, Kohler H, Sester M (2008) PD-1 expression and IL-2 loss of cytomegalovirus- specific T cells correlates with viremia and reversible functional anergy. *Am J Transplant* 8:1486-1497
  132. Sester U, Wilkens H, van Bentum K, Singh M, Sybrecht GW, Schafers HJ, Sester M (2009) Impaired detection of Mycobacterium tuberculosis immunity in patients using high levels of immunosuppressive drugs. *Eur Respir J* 34:702-710
  133. Simsek H, Alpar S, Ucar N, Aksu F, Ceyhan I, Gozalan A, Cesur S, Ertek M (2010) Comparison of tuberculin skin testing and T-SPOT.TB for diagnosis of latent and active tuberculosis. *Jpn J Infect Dis* 63:99-102
  134. Smirnoff M, Patt C, Seckler B, Adler JJ (1998) Tuberculin and anergy skin testing of patients receiving long-term hemodialysis. *Chest* 113:25-27
  135. Sodhi A, Gong J, Silva C, Qian D, Barnes PF (1997) Clinical correlates of interferon gamma production in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis* 25:617-620
  136. Solovic I, Sester M, Gomez-Reino JJ, Rieder HL, Ehlers S, Milburn HJ, Kampmann B, Hellmich B, Groves R, Schreiber S, Wallis RS, Sotgiu G, Scholvinck EH, Goletti D, Zellweger JP, Diel R, Carmona L, Bartalesi F, Ravn P, Bossink A, Duarte R, Erkens C, Clark J, Migliori GB, Lange C (2010) The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 36:1185-1206
  137. Somoskovi A, Dormandy J, Mayrer AR, Carter M, Hooper N, Salfinger M (2009) "Mycobacterium canettii" isolated from a human immunodeficiency virus-positive patient: first case recognized in the United States. *J Clin Microbiol* 47:255-257
  138. Song KH, Jeon JH, Park WB, Kim SH, Park KU, Kim NJ, Oh MD, Kim HB, Choe KW (2009) Usefulness of the whole-blood interferon-gamma release assay for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 63:182-187
  139. Steingart KR, Henry M, Laal S, Hopewell PC, Ramsay A, Menzies D, Cunningham J, Weldingh K, Pai M (2007) Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *PLoS Med* 4:e202
  140. Styblo K, Ferlinz C (1994). BCG vaccination in West Germany?. *Pneumologie* 48:151-155
  141. Sutherland R, Yang H, Scriba TJ, Ondondo B, Robinson N, Conlon C, Suttill A, McShane H, Fidler S, McMichael A, Dorrell L (2006) Impaired IFN-gamma-secreting capacity in mycobacterial antigen-specific CD4 T cells during chronic HIV-1 infection despite long-term HAART. *Aids* 20:821-829
  142. Swaminathan S, Subbaraman R, Venkatesan P, Subramanyam S, Kumar SR, Mayer KH, Narayanan PR (2008) Tuberculin skin test results in HIV-infected patients in India: implications for latent tuberculosis treatment. *Int J Tuberc Lung Dis* 12:168-173
  143. Syed Ahamed Kabeer B, Raman B, Thomas A, Perumal V, Raja A (2010) Role of QuantiFERON-TB gold, interferon gamma inducible protein-10 and tuberculin skin test in active tuberculosis diagnosis. *PLoS One* 5:e9051
  144. Teixeira EG, Kritski A, Ruffino-Netto A, Steffen R, Lapa ESJR, Belo M, Luiz RR,

- Menzies D, Trajman A (2008) Two-step tuberculin skin test and booster phenomenon prevalence among Brazilian medical students. *Int J Tuberc Lung Dis* 12:1407-1413
145. Tesfa L, Koch FW, Pankow W, Volk HD, Kern F (2004) Confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* infection by flow cytometry after ex vivo incubation of peripheral blood T cells with an ESAT-6-derived peptide pool. *Cytometry B Clin Cytom* 60:47-53
  146. Thomas MM, Hinks TS, Raghuraman S, Ramalingam N, Ernst M, Nau R, Lange C, Kosters K, Gnanamuthu C, John GT, Marshall B, Lalvani A (2008) Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* meningitis by enumeration of cerebrospinal fluid antigen-specific T-cells. *Int J Tuberc Lung Dis* 12:651-657
  147. Tissot F, Zanetti G, Francioli P, Zellweger JP, Zysset F (2005) Influence of bacille Calmette-Guerin vaccination on size of tuberculin skin test reaction: to what size? *Clin Infect Dis* 40:211-217
  148. Triverio PA, Bridevaux PO, Roux-Lombard P, Niksic L, Rochat T, Martin PY, Saudan P, Janssens JP (2009) Interferon-gamma release assays versus tuberculin skin testing for detection of latent tuberculosis in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 24:1952-1956
  149. Tsicopoulos A, Hamid Q, Varney V, Ying S, Moqbel R, Durham SR, Kay AB (1992) Preferential messenger RNA expression of Th1-type cells (IFN-gamma+, IL-2+) in classical delayed-type (tuberculin) hypersensitivity reactions in human skin. *J Immunol* 148:2058-2061
  150. Tubach F, Salmon D, Ravaud P, Allanore Y, Goupille P, Breban M, Pallot-Prades B, Pouplin S, Sacchi A, Chichemanian RM, Bretagne S, Emilie D, Lemann M, Lortholary O, Mariette X (2009) Risk of tuberculosis is higher with anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody therapy than with soluble tumor necrosis factor receptor therapy: The three-year prospective French Research Axed on Tolerance of Biotherapies registry. *Arthritis Rheum* 60:1884-1894
  151. van Rie A, Warren R, Richardson M, Victor TC, Gie RP, Enarson DA, Beyers N, van Helden PD (1999) Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med* 341:1174-1179
  152. van Soolingen D, van der Zanden AG, de Haas PE, Noordhoek GT, Kiers A, Foudraire NA, Portaels F, Kolk AH, Kremer K, van Embden JD (1998) Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J Clin Microbiol* 36:1840-1845
  153. Viana-Niero C, Gutierrez C, Sola C, Filliol I, Boulahbal F, Vincent V, Rastogi N (2001) Genetic diversity of *Mycobacterium africanum* clinical isolates based on IS6110-restriction fragment length polymorphism analysis, spoligotyping, and variable number of tandem DNA repeats. *J Clin Microbiol* 39:57-65
  154. Villarino ME, Huebner RE (1996) The role of BCG vaccine in the prevention and control of tuberculosis in the United States. A joint statement by the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis and the Advisory Committee on Immunization Practices. *MMWR Recomm Rep* 45:1-18
  155. Waldrop SL, Davis KA, Maino VC, Picker LJ (1998) Normal human CD4+ memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis. *J Immunol* 161:5284-5295
  156. Wang L, Turner MO, Elwood RK, Schulzer M, FitzGerald JM (2002) A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax* 57:804-809
  157. WHO (2009). *Global Tuberculosis Control : epidemiology, strategy, financing : WHO report 2009* (World Health Organization)
  158. WHO (2010a). *Global Tuberculosis Control 2010: WHO report 2010* (World Health

- Organization)
159. WHO (2010b) Global Tuberculosis Control: key findings from the December 2009 WHO report. *Wkly Epidemiol Rec* 85:69-80
  160. Wilkinson KA, Kon OM, Newton SM, Meintjes G, Davidson RN, Pasvol G, Wilkinson RJ (2006) Effect of treatment of latent tuberculosis infection on the T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *J Infect Dis* 193:354-359
  161. Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Pathan A, Ewer K, Prakash M, Klenerman P, Maskell N, Davies R, Pasvol G, Lalvani A (2005) Ex vivo characterization of early secretory antigenic target 6-specific T cells at sites of active disease in pleural tuberculosis. *Clin Infect Dis* 40:184-187
  162. Winthrop KL, Chang E, Yamashita S, Iademarco MF, LoBue PA (2009) Nontuberculous mycobacteria infections and anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *Emerg Infect Dis* 15:1556-1561
  163. Woeltje KF, Mathew A, Rothstein M, Seiler S, Fraser VJ (1998) Tuberculosis infection and anergy in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 31:848-852
  164. Wolfe F, Michaud K, Anderson J, Urbansky K (2004) Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy. *Arthritis & Rheumatism* 50:372-379
  165. Yamada T, Nakajima A, Inoue E, Tanaka E, Hara M, Tomatsu T, Kamatani N, Yamanaka H (2006) Increased risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis in Japan. *Ann Rheum Dis* 65:1661-1663
  166. Young DB, Gideon HP, Wilkinson RJ (2009) Eliminating latent tuberculosis. *Trends Microbiol* 17:183-188
  167. Zhang S, Shao L, Mo L, Chen J, Wang F, Meng C, Zhong M, Qiu L, Wu M, Weng X, Zhang W (2010) Evaluation of gamma interferon release assays using *Mycobacterium tuberculosis* antigens for diagnosis of latent and active tuberculosis in *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated populations. *Clin Vaccine Immunol* 17:1985-1990

## 7 Publikationen

Ergebnisse der Arbeit wurden wie folgt publiziert:

**Evaluation of latent tuberculosis infection in patients with inflammatory arthropathies before treatment with TNF-alpha blocking drugs using a novel flow-cytometric interferon-gamma release assay.**

Dinser R, Fousse M, Sester U, Albrecht K, Singh M, Köhler H, Müller-Ladner U, Sester M. Rheumatology (Oxford). 2008 Feb;47(2):212-8.

**Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active states.**

Sester U, Fousse M, Dirks J, Mack U, Prasse A, Singh M, Lalvani A, Sester M. PloS One. 2011 Mar 15;6(3):e17813.

Des Weiteren wurden Teile der Arbeit als Poster und/oder Vortrag auf Kongressen vorgestellt:

**Optimierter Nachweis einer Immunität gegen M. tuberculosis durch Analyse der T-Zellreaktivität gegen die spezifischen Proteine ESAT-6 und CFP-10.**

Fousse M, Mack U, Hodapp T, Sester U, Sybrecht GW, Köhler H, Sester M.

51. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft, Neustadt an der Weinstrasse, 22.-24.02.2007, Poster.

**Optimized diagnosis of latent tuberculosis infection by analysis of ESAT-6 and CFP-10 specific T cells reactivity using a rapid flow-cytometric assay.**

Fousse M, Mack U, Hodapp T, Sester U, Sybrecht GW, Köhler H, Sester M.

37th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg, 05.-08.09.2007, Poster.

**Evaluation of latent tuberculosis infection in patients with inflammatory arthropathies before treatment with tumour necrosis factor- $\alpha$  blocking drugs using a novel flowcytometric interferon- $\gamma$  release assay.**

**Fousse M**, Dinser R, Sester U, Albrecht K, Singh M, Köhler H, Müller-Ladner U, Sester M.

37th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg, 05.-08.09.2007,  
Vortrag und Poster .

## 8 Danksagung

Mit Beendigung der Doktorarbeit wird ein Projekt realisiert, dessen Größe und Vielschichtigkeit ich anfangs kaum begreifen konnte und dessen Umsetzung viel Arbeit, Mühe und Motivation gekostet hat. Für das Gelingen dieses Unterfangens gebührt nicht wenigen Personen mein Dank.

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. Martina Sester und Herrn PD Dr. Urban Sester meinen Dank ausdrücken. Unter ihrer Betreuung habe ich nicht nur einen Einblick in die Untiefen der Immunologie gewonnen, sondern auch im Zuge der Durchführung und Interpretation der Experimente die Komplexität wissenschaftlichen Arbeitens schätzen gelernt. Anfangs ermöglichte mir ihre vertrauensvolle, motivierende und geduldige Betreuung ein Teilhaben am Laboralltag, später ein Mitfiebern bei Projekten und zuletzt das Einbringen eigener Ideen in den dynamischen Prozess der Experimentgestaltung. Großer Dank gebührt der medizinisch-technischen Assistentin Frau Rebecca Ruth, welche mir die praktischen Grundlagen bei der Durchführung der Experimente vermittelte und deren Exaktheit und Effizienz ich bis heute anzustreben versuche. Daneben möchte ich mich bei allen weiteren Mitgliedern des Laborteams bedanken, durch deren angenehme und freundschaftliche Gestaltung des Laboralltages ich gerne meine Zeit dort verbrachte.

Ohne den enormen Einsatz zahlreicher Freunde, Probanden und Patienten wäre es mir nicht möglich gewesen, dieses Projekt auch nur annähernd zu realisieren. Ich möchte all denjenigen danken, die bereitwillig Blut spendeten und sich Hauttests anlegen ließen trotz der damit verbundenen Strapazen.

Ohne die emotionale, motivierende und finanzielle Unterstützung meiner Eltern wäre sowohl das Medizinstudium als auch die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. In tiefer Verbundenheit möchte ich Ihnen dafür meinen Dank ausdrücken.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name	Mathias Alfons Fousse
Geburtsdatum	22.05.1982
Geburtsort	Neunkirchen (Saar)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Konfession	römisch-katholisch
Anschrift	Virchowstr. 59, 66424 Homburg

### Schulbildung und Zivildienst

08/1988 – 07/1992	Grundschule Sonnenfeld Homburg
09/1992 – 06/2001	Kath. Gymnasium Johanneum Homburg, Abiturnote: 1,3
08/2001 – 05/2002	Zivildienst Universitätsklinik des Saarlandes, Innere Medizin I (Hämatologie und Onkologie)

### Akademische Ausbildung

10/2002 – 12/2008	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
08/2004	Ärztliche Vorprüfung – Note: 1,66
Seit 04/2007	Aufnahme der Promotion an dem Universitätsklinik des Saarlandes, Innere Medizin IV (Nephrologie) bei Prof. Dr. rer. nat. Martina Sester
08/2007 – 12/2007	Praktisches Jahr, Tertial Neurologie: Universitätsklinik zu Köln
12/2007 – 03/2008	Praktisches Jahr, Tertial Innere Medizin: Universitätsklinik des Saarlandes (Gastroenterologie und Pneumologie)
04/2008 – 07/2008	Praktisches Jahr, Tertial Chirurgie: Universitätsklinik des Saarlandes (Herz-Thorax-Chirurgie, Neurochirurgie und Unfallchirurgie)
12/2008	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung – Note: 1,5



## **Weiterbildungszeit als Assistenzarzt**

04/2009 – 03/2010	Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universitätsklinik des Saarlandes (Prof. Dr. med. M. Riemenschneider)
Seit 06/2010	Klinik für Neurologie, Universitätsklinik des Saarlandes (Prof. Dr. med. K. Faßbender)