

DIPLOMARBEIT

Analyse der zellmedierten erworbenen Immunität anhand eines Dual- Color- ELISpot

Quantitative Messung der Zytokine Interferon γ und Interleukin 2

eingereicht von

Sandra Mairhofer

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Innere Medizin,
Klinische Abteilung für Rheumatologie und Immunologie**

unter der Anleitung von

a. o. Univ. Prof. Dr. Hans Peter Brezinschek

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, im September 2012


Unterschrift

Danksagungen

Zu Beginn möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern für die langjährige Unterstützung bedanken, denn ohne sie wäre das Medizinstudium nicht möglich gewesen! Herrn Univ. Prof. Dr. Brezinschek danke ich insbesondere für die zahlreichen Anregungen und Impulse im Laufe der Betreuung der Diplomarbeit sowie dafür, dass ich anhand dieses Projektes einen Einblick in die medizinische Forschung gewinnen konnte. Ein ganz besonderer Dank gebührt außerdem Herrn OA Dr. Holger Flick von der Abteilung für Pulmologie für die erfolgreiche Zusammenarbeit sowie Frau Evelin Spieß für die tatkräftige Unterstützung sowohl bei der Planung, als auch der praktischen Umsetzung der Arbeiten im Immunologie- Labor.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Freund Johannes dafür danken, dass er mir in jeder Lebenslage stets hilfreich zur Seite gestanden hat!

Gleichheitsgrundsatz

Zu Gunsten der einfacheren Lesbarkeit sind personenbezogene Bezeichnungen in dieser Arbeit jeweils nur in der männlichen Form angeführt; sie gelten aber unabhängig davon für beide Geschlechter gleichermaßen.

Zusammenfassung

Personen mit rheumatoider Arthritis weisen im Vergleich zur Normalbevölkerung ein erhöhtes Infektionsrisiko auf, das neben der Autoimmunerkrankung an sich auch auf eine immunsupprimierende Dauertherapie zurückzuführen ist. Daher empfiehlt sich bei diesen Personen unter anderem die Durchführung der Impfungen gegen Pneumokokken und Influenza. Diese haben üblicherweise eine ausreichende protektive Immunantwort zur Folge- wobei dies davon abhängt, welche Immunsuppressiva mit welchen Impfstoffen kombiniert werden. Außerdem sollte aufgrund der möglichen Reaktivierung einer latenten tuberkulösen Infektion (LTBI) vor Beginn einer immunmodulierenden Therapie ein adäquates Tuberkulose (TBC)- Screening stattfinden. Obwohl Personen mit LTBI symptomfrei sind und von ihnen keine Infektionsgefahr ausgeht, besteht dennoch ein gewisses Risiko für den Ausbruch einer aktiven TBC, vor allem bei supprimiertem Immunsystem. Allerdings existiert zur Zeit keine Gold- Standard- Methode zur Diagnostik einer LTBI.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Aussagekraft von Single- Color- ELISpot- Assays zu erweitern, um Personen mit LTBI- in Zusammenschau mit anderen klinischen Befunden- zuverlässig von jenen mit einer aktiven TBC- Infektion unterscheiden und dementsprechend therapieren zu können sowie einen routinemäßigen Einsatz dieses modifizierten Immunoassays, unter anderem bei Personen mit supprimiertem Immunsystem, zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde die zellmedierte spezifische Immunantwort von sechs Probanden mit LTBI, einer Person mit einer aktiven Lymphknoten- TBC und drei gesunden Personen jeweils separat sowohl mittels T- SPOT.TB™ (Oxford Immunotec)- einer vereinfachten Variante der konventionellen Single- Color- ELISpot- Technik zum Nachweis von Interferon γ (IFN γ)- als auch mittels Dual- Color- ELISpot (R&D Systems) zur simultanen quantitativen Messung von IFN γ und Interleukin 2 untersucht.

T- SPOT.TB™: Bei vier Personen mit LTBI zeigt der T- SPOT.TB™ ein positives und bei einer gesunden Person ein negatives Testergebnis; bei den restlichen fünf Probanden hingegen war die Auswertung des Tests aufgrund hoher unspezifischer Hintergrundsignale nicht möglich.

Dual- Color- ELISpot: Die untere erforderliche Grenze für eine optimale Zellkonzentration des Dual- Color- ELISpot liegt im Bereich von 200.000 PBMC pro Well. Eine aktive TBC- Infektion ist unter Verwendung von unstimulierten PBMC

tendentiell mit der höchsten Anzahl an mono- und polyfunktionellen T- Zellen vergesellschaftet, während Personen mit LTBI eher zur geringsten Zytokinproduktion neigen. Nach Stimulation der PBMC mit TBC- assoziierten Antigenen (ESAT-6 und CFP 10) kann das Dual- Color- ELISpot- Assay aufgrund einer inhomogenen Oberfläche bzw. Konsistenz der einzelnen Wells sowie einer zu hohen Anzahl an unspezifischen Hintergrundsignalen nicht ausgewertet werden. Diese Tatsache könnte auf die Verwendung von eingefrorenen PBMC bzw. einer Interferenz/ Inkompatibilität der verwendeten Antigene mit der PVDF- Platte des Dual- Color- ELISpot- Assays zurückzuführen sein. Weiterführende Studien mit einer höheren Fallzahl und einer versuchsweisen in vitro Stimulierung der PBMC mit den Antigenen ESAT-6 und CFP 10 vor Einsetzen der PBMC in die Wells des Dual- Color- ELISpot bzw. unter Verwendung von frisch isoliertem Probenmaterial werden benötigt, um die erzielten Ergebnisse zu (re)evaluieren.

Abstract

Patients with rheumatoid arthritis are two times more susceptible to infection than the healthy population. The autoimmune disease itself on the one hand and the immunosuppressive treatment to control the chronic inflammatory process on the other hand are responsible for the increased risk for developing infectious diseases. Therefore, vaccinations against pneumococci and influenza are recommended. Patients with rheumatoid arthritis and immunosuppressive treatment often show a decreased immune reaction following vaccination. However, immunization responses are normally sufficient to ensure an optimal protection from infection, depending on type and degree of immunosuppression. Moreover, at the beginning of an immunosuppressive treatment, an adequate screening against tuberculosis (TBC) is recommended. Immunosuppressive agents, especially biologicals, are associated with the risk of reactivation of latent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Actually, there exists no gold standard method for the diagnosis of latent tuberculosis infection.

The aim of this work is to improve the impact of ELISpot assays on the diagnosis of tuberculosis. In consideration with other clinical or medical findings, a modified ELISpot assay could contribute to differentiate persons with latent tuberculosis infection from those with active tuberculosis. Hence, a common use of this immunoassay could contribute to stop progression into an active and contagious disease. For this purpose, the cell-mediated adaptive immune response from six persons with latent TBC infection, one person with active lymph nodes tuberculosis and three healthy controls was evaluated with T-SPOT.TB™ (Oxford Immunotec) and Dual-Color-ELISpot (R&D Systems), respectively. The T-SPOT.TB™ represents a simplified Single-Color-ELISpot assay for the measurement of Interferon γ (IFN γ). In contrast, the use of a Dual-Color-ELISpot enables to assess the *simultaneous* release of IFN γ and Interleukin 2 (IL-2).

T- SPOT.TB™: The T- SPOT.TB™ showed positive results in four persons with latent tuberculosis and negative results in one healthy control. In the other five cases, an extremely high background activity did not allow any results interpretation of the T-SPOT.TB™.

Dual- Color- ELISpot: For an optimal performance, the Dual- Color- ELISpot requires a concentration of 200.000 PBMC per well. When using unstimulated PBMC, active tuberculosis seems to be associated with the highest amount of both monofunctional and polyfunctional cells. In contrast, persons with latent infection with *Mycobacterium*

tuberculosis rather showed the lowest cytokine release. After stimulation with TBC-specific antigens (ESAT-6 und CFP 10), the wells of the Dual- Color- ELISpot microtiter plate showed an inhomogeneous texture and an extremely high background activity which made an adequate results interpretation impossible. These facts could be attributed either to the use of cryopreserved human PBMC or an interaction between the antigens and the microtiter plate of the Dual- Color- ELISpot assay. To reassess these results, further studies are needed which include a larger study population and use freshly isolated PBMC instead of cryopreserved cells. Furthermore, *in vitro* stimulation of the PBMC with the TBC- associated antigens prior of placing them into the wells of the Dual- Color- ELISpot assay is recommended.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	ii
Zusammenfassung	iii
Abstract	v
Inhaltsverzeichnis	vii
Abkürzungen	ix
Abbildungsverzeichnis	xi
Tabellenverzeichnis	xii
1 Einleitung	1
2 Literaturrecherche	5
2.1 Impfungen bei rheumatoider Arthritis	5
2.2 ELISpot als Evaluierungsmethode für die Wirksamkeit von Impfstoffen	10
2.3 Pneumokokken- Impfstoffe	14
2.3.1 Einführung	14
2.3.2 Eigenschaften und Wirkung	17
2.3.3 T- Zell- Stimulation und Zytokinexpression	20
2.3.4 Immunantwort bei Neugeborenen und Kindern	32
2.4 Pneumokokken- Impfung und Immunsuppression	36
2.4.1 Vorwort.....	36
2.4.2 Monotherapie mit Methotrexat.....	37
2.4.3 TNF α - Inhibitoren	38
2.4.4 Kortikosteroide	42
2.4.5 Abatacept	43
2.4.6 Rituximab	45
2.5 Vergleich mit anderen Impfstoffen	47
2.5.1 Influenza	47
2.5.2 Hepatitis B	49
2.5.3 Lebendimpfstoffe.....	50
2.5.4 Tuberkulose	52
3 Material und Methoden	56
3.1 Vorstellung des Projektes/ Zielsetzung.....	56
3.2 Erforderliche Geräte	62
3.3 Erforderliche Reagenzien.....	63

3.4	Allgemeine Vorbereitungen.....	64
3.4.1	Probengewinnung, Zellisolierung und Einfrieren	64
3.4.2	Auftauen der eingefrorenen Zellen.....	65
3.4.3	Bestimmung der Viabilität.....	66
3.5	T- SPOT.TB™	68
3.6	Dual- Color- ELISpot	70
4	Ergebnisse- Resultate	74
4.1	Studienpopulation	74
4.2	Erster Testdurchgang	75
4.2.1	Spotauswertung des T- SPOT.TB™	75
4.2.2	Spotauswertung des Dual- Color- ELISpot.....	77
4.3	Zweiter Testdurchgang	81
4.3.1	Wiederholung des T- SPOT.TB™	81
4.3.2	Dual- Color- ELISpot mit Antigen- Stimulation.....	83
5	Diskussion.....	85
6	Literaturverzeichnis	91

Abkürzungen

7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazole
Anti- CCP- Ak	Antikörper gegen cyclisches citrulliniertes Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
APZ	Antigen- präsentierende Zelle
BCG	Bacille Calmette- Guérin
BCIP/NBT	5-Bromo-4-Chloro-3'Indolylphosphatase p- Toluidine salt/ Nitro Blue Tetrazolium Chloride
BCR	B- Zell- Rezeptor
BSG	Blutkörperchen- Senkungsgeschwindigkeit
CAP	Community acquired pneumonia
CbpA	Choline- binding Protein A
CD4	Cluster of differentiation 4
CFP 10	Culture filtrate protein 10
CMV	Cytomegalievirus
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CRP	C- reaktives Protein
CTLA4	Cytotoxic T lymphocyte associated antigen
CVID	Common variable immunodeficiency
DMARDs	Disease modifying antirheumatic drugs
ELISpot	Enzyme-linked immunosorbent Spot
ESAT-6	Early secretory antigenic target 6
HBV	Hepatitis B- Virus
HCV	Hepatitis- C- Virus
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Humane Leukozyten- Antigene
HRP	Horseradish peroxidase
ICOS	Inducible co-stimulator
ICOS-L	Inducible co-stimulator- Ligand
IFN γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IGRA	Interferon γ - Release- Assay
IL-2	Interleukin 2
LTBI	Latente tuberkulöse Infektion
MHC	Major histocompatibility complex

MMR	Masern- Mumps- Röteln
M. tuberculosis	Mycobacterium tuberculosis
MTX	Methotrexat
MVA85A	Modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A
NK- Zellen	Natural killer- Zellen
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PcsB	Streptococcal Protein required for Cell Separation B
PHA	Phytohämagglutinin
Ply	Pneumolysin
PsaA	Pneumococcal surface Antigen Protein A
PspA	Pneumococcal surface Protein A
PVDF- Platte	Polyvinylidenfluorid- Platte
QFT™	QuantIFERON- TB Gold In- Tube- Test (Cellestis)
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktoren
RTX	Rituximab
SAP	Signaling lymphocyte activation molecule associated protein
StkP	Serin/Threonin Protein Kinase
TBC	Tuberkulose
TCR	T- Zell- Rezeptor
TGFβ	Transforming growth factor β
TH	T- Helferzellen
THT	Tuberkulin- Hauttest
TNFα	Tumor- Nekrosefaktor α
VZV	Varizella zoster- Virus

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundprinzip der ELISpot- Technik, modifiziert nach [23]	13
Abbildung 2: Schematische Darstellung der „Cognate T- B- interaction“ [11].....	25
Abbildung 3: a) Aktivierung der Synthese von IgE durch IL-4 und IL-13 und b) Aktivierung von Makrophagen durch IFN γ [11]	31
Abbildung 4: Schematische Darstellung der wichtigsten Arbeitsschritte [16].....	61
Abbildung 5: Überblick über die Spotauswertung des T- SPOT.TB™	76
Abbildung 6: Sekretion von IFN γ ohne Antigen- Stimulation.....	78
Abbildung 7: Sekretion von IL- 2 ohne Antigen- Stimulation.....	79
Abbildung 8: Simultane Sekretion von IFN γ und IL- 2 ohne Antigen- Stimulation	80
Abbildung 9: Spotauswertung im zweiten Testdurchgang des T- SPOT.TB™	82
Abbildung 10: Dual- Color- ELISpot nach Stimulation mit ESAT- 6 und CFP 10.....	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ACR- Diagnosekriterien der rheumatoiden Arthritis [18]	6
Tabelle 2: THT, QFT™ und T- SPOT.TB™ im Vergleich [16] [18] [73] [74] [75].....	59
Tabelle 3: Allgemeine Vorbereitungen zur Durchführung eines ELISpot- Assays [76]	64
Tabelle 4: Auftauen der PBMC mit C.T.L.- Anti- Aggregate™ Wash Supplement [76].....	66
Tabelle 5: Bestimmung der Viabilität mittels Apoptose- Assay [77]	67
Tabelle 6: Praktische Durchführung des T- SPOT.TB™ [16]	69
Tabelle 7: Praktische Durchführung des Dual- Color- ELISpot [17].....	72
Tabelle 8: Charakteristika der Studienpopulation	74
Tabelle 9: Spotauswertung des ersten Testdurchganges des T- SPOT.TB™	75
Tabelle 10: Ergebnisinterpretation des ersten Testdurchganges des T- SPOT.TB™	76
Tabelle 11: Anzahl an blauen, roten und violetten Spots pro Proband und Konzentration	77
Tabelle 12: Sekretion von IFN γ in Abhängigkeit vom Immunstatus.....	78
Tabelle 13: Sekretion von IL- 2 in Abhängigkeit vom Immunstatus.....	79
Tabelle 14: Simultane Sekretion von IFN γ und IL-2 in Abhängigkeit vom Immunstatus.....	80
Tabelle 15: Anzahl an Spots im zweiten Testdurchgang des T- SPOT.TB™	81
Tabelle 16: Ergebnisinterpretation des zweiten Testdurchganges des T- SPOT.TB™	82
Tabelle 17: Anzahl an blauen, roten und violetten Spots nach Antigen- Stimulation.....	84

1 Einleitung

Autoimmunerkrankungen gehen mit einer erhöhten Infektanfälligkeit bzw. -neigung im Vergleich zur Normalbevölkerung einher, welche einerseits auf gestörte Regulationsmechanismen des Immunsystems im Rahmen der Grunderkrankung und andererseits auf die Behandlung derselben mit immunsupprimierenden Medikamenten zurückzuführen ist [1] [2] [3]. Die Tatsache, dass einer Vielzahl an- mitunter lebensbedrohlichen- Infektionen anhand von diversen Impfungen vorgebeugt werden kann, ist folglich bei Personen mit supprimiertem Immunsystem von besonderer Bedeutung [1] [4]. Zahlreiche Richtlinien empfehlen daher bei diesen Risikogruppen u.a. die Durchführung von Impfungen gegen Pneumokokken und Influenza [1] [3] [5]. Allerdings besteht unter einer immunsuppressiven Therapie die Möglichkeit einer eingeschränkten Immunantwort gegen bestimmte Impfstoffe [1] [3] [4]. Außerdem zeigt sich bei Patienten unter einer kontinuierlichen immunsuppressiven Therapie eine verkürzte Dauer der protektiven Immunantwort [3].

Im Fokus dieser Arbeit stehen die Auswirkungen ausgewählter Immunsuppressiva-Klassen, insbesondere aus der Klasse der sog. „Biologicals“, auf die Effektivität von Pneumokokken- Impfungen bei Personen mit rheumatoider Arthritis. In weiterer Folge sollen diese mit den Wechselwirkungen anderer Impfstoffe, nämlich der Protein- basierten Impfstoffe gegen Influenza und Hepatitis B einerseits sowie der Lebendimpfstoffe gegen Masern- Mumps- Röteln und Varizella zoster andererseits, verglichen werden. Diese Arbeit beschränkt sich auf folgende Immunsuppressiva, welche einen festen Platz in der konservativen Behandlung der rheumatoiden Arthritis einnehmen:

- 1) Methotrexat,
 - 2) Adalimumab,
 - 3) Infliximab,
 - 4) Etanercept,
 - 5) Kortikosteroide,
 - 6) Abatacept und
 - 7) Rituximab.
- } TNF α - Inhibitoren

Außerdem wird das Risiko einer Tuberkuloseinfektion, welches mit einer immunsupprimierenden Therapie, insbesondere aus der Gruppe der TNF α - Inhibitoren, assoziiert ist und vorwiegend auf der Reaktivierung einer latenten tuberkulösen Infektion

(LTBI) beruht [6], erörtert. Zudem befassen sich aktuell viele Studien mit der Entwicklung von neuen Impfstoffen gegen Tuberkulose [7] [8].

Mit Hilfe von quantitativen Messungen der zellulären (und humoralen) Immunantwort kann die Wirksamkeit von Impfstoffen effektiv beurteilt bzw. erfasst werden [9]. In diesem Zusammenhang sticht besonders die Technik des „Enzyme-linked immunosorbent Spot“ (ELISpot) hervor, welche eine der wichtigsten Immunoassays zur Evaluierung von Antigen- spezifischen T- Zellen im Rahmen von klinischen (Impf-) Studien darstellt [10]. T- Lymphozyten üben eine zentrale Rolle in der Regulation der physiologischen Immunantwort aus und spielen u.a. in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Immundefekten eine entscheidende Rolle [11]. Mit Hilfe von ELISpot- Assays können spezifische Funktionen der T- Lymphozyten auf dem Niveau einer einzelnen Zelle analysiert werden, welche nach entsprechendem Antigenkontakt verschiedene Zytokine, u.a. Interleukin 2 (IL-2), Tumor- Nekrosefaktor α (TNF α) oder Interferon γ (IFN γ), sezernieren. In diesem Kontext gilt die Messung des Zytokins Interferon γ mit Hilfe von ELISpot-Assays als Standardmethode [9] [10]. Allerdings korreliert die alleinige Bestimmung von IFN γ mithilfe der konventionellen (Single- Color-) ELISpot- Methodik nicht immer mit der Ausbildung einer langanhaltenden Immunität, weshalb die gleichzeitige Messung von IFN γ und IL-2 anhand eines sog. „Dual- Color- ELISpot- Assays“ einen besseren Indikator für die Entwicklung einer Gedächtnisfunktion darstellen könnte. Einige Studien weisen nämlich darauf hin, dass IFN γ als Parameter der primären Effektorantwort anzusehen ist, während die (simultane) Sekretion von IL-2 die Entwicklung einer langanhaltenden Gedächtnisfunktion widerspiegelt [12] [13] [14]. Zudem gibt es Hinweise dafür, dass bestimmte Zytokinprofile mit dem jeweiligen Immunstatus der untersuchten Person korrelieren könnten. So z.B. geht die gleichzeitige Sekretion von IFN γ , IL-2 und TNF α in 85% bis 90% mit einer *aktiven* Tuberkulose (TBC)- Infektion einher, während dies nur in 10% bis 15% bei Patienten mit einer latenten tuberkulösen Infektion der Fall ist. Bei einer *latenten* TBC- Infektion hingegen zeigt sich eine überwiegende Sekretion von IFN γ bzw. von IFN γ in Kombination mit IL-2 [15].

Das Hauptziel dieser Arbeit besteht darin, durch die simultane quantitative Messung der Zytokine IFN γ und IL-2 anhand eines Dual- Color- ELISpot- Assays und der sich daraus ergebenden Möglichkeit, zwischen Primärantwort (Stimulation von naiven T-Zellen) und Sekundärantwort (Stimulation von Memory- T- Zellen) der zellmedierten, erworbenen Immunität unterscheiden sowie Rückschlüsse auf die jeweilige Krankheitsaktivität ziehen zu können, die Aussagekraft bzw. das Anwendungsgebiet von traditionellen Single- Color-

ELISpot- Assays, welche die Sekretion eines einzelnen Zytokins nachweisen, zu erweitern und eine routinemäßige Verwendung des Dual- Color- ELISpot- Assays zu diagnostischen Zwecken, vor allem bei Personen mit Immundefekten (z.B. „Common variable immunodeficiency“, CVID) und Patienten unter immunsuppressiver Therapie, zu ermöglichen. Außerdem soll dieses Projekt zu einer Verbesserung der aktuell verfügbaren Methoden der TBC- Diagnostik, insbesondere von latenten Tuberkulose- Infektionen, beitragen. Im Rahmen der Literaturrecherche hat sich herausgestellt, dass bisher kaum Vergleichsstudien hinsichtlich der Anwendung von Dual- Color- ELISpot- Assays verfügbar sind.

Exemplarisch für klassische „Mono“- bzw. Single- Color- ELISpot- Immunoassays stützt sich diese Arbeit auf den sog. „T- SPOT.TB™“ (Oxford Immunotec) [16], welcher zum Nachweis von in vitro aktivierten, IFN γ - sezernierenden T- Effektorzellen gegen Mycobacterium tuberculosis- assoziierte Antigene und somit zur Unterstützung bzw. Absicherung der Diagnosefindung bei Patienten mit Verdacht auf eine latente bzw. aktive Tuberkuloseinfektion dient [16]. Mithilfe des IFN γ /IL-2- Dual- Color- ELISpot- Assays der Firma R&D Systems [17] können im Gegensatz zum T- SPOT.TB™ sowohl mono- als auch polyfunktionelle T- Lymphozyten erfasst werden [17]; damit dieses Immunoassay aber in der alltäglichen Praxis eingesetzt werden kann, ist es unumgänglich, im Rahmen der Analysen im Labor der Immunologie mittels Vergleich von Single- und Dual- Color- ELISpot- Assay einen entsprechenden Referenzbereich für die Ergebnisinterpretation zu ermitteln.

In dieser Arbeit steht die Analyse der *zellmedierten* Mechanismen des erworbenen Immunsystems im Vordergrund; hinsichtlich der Aspekte der spezifischen humoralen Immunität verweise ich auf weiterführende Literatur.

Die Diplomarbeit gliedert sich in folgende Abschnitte:

In Kapitel 2 ist der Stand der aktuellen Literatur, ausgehend von verschiedenen Fachbüchern und medizinischen Datenbanken, abgebildet. Zu Beginn werden allgemeine Aspekte der ELISpot- Methodik zur funktionellen Analyse der spezifischen zellulären Immunantwort aufgezeigt, Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Pneumokokken- Impfstoffe diskutiert und Unterschiede zwischen infantilem und adultem Immunsystem erörtert. Anschließend werden die Auswirkungen ausgewählter Immunsuppressiva- Klassen auf die Immunantwort nach Pneumokokken- Impfungen bei Personen mit

rheumatoider Arthritis beschrieben und mit jenen von anderen Impfstoffen (Influenza, Hepatitis B, Masern- Mumps- Röteln und Varizella zoster) verglichen. In weiterer Folge werden das Therapie- assoziierte Risiko einer Tuberkuloseinfektion bei immunsupprimierten Personen und die daraus resultierende Notwendigkeit eines vorab durchgeführten adäquaten Tuberkulose- Screenings sowie die aktuellen Bestrebungen zur Entwicklung neuer Impfstoffe gegen Tuberkulose thematisiert.

Kapitel 3 und 4 befassen sich im Anschluss daran mit den praktischen Aspekten der ELISpot- Methode zur Messung der zellulären Immunantwort, wobei der T- SPOT.TB™ als traditioneller Single- Color- Immunoassay mit einem Dual- Color- ELISpot- Assay zur quantitativen Messung von IFN γ und IL-2 verglichen wird. Zu Beginn werden neben Vorstellung des Projektes, Zielsetzung, benötigten Materialien und allgemeinen Vorbereitungen die erforderlichen Schritte zur technischen Durchführung beider Immunoassays aufgezeigt, gefolgt von der Auswertung der Daten, die durch parallele Durchführung und direkten Vergleich beider Testverfahren im Labor der Immunologie an der Medizinischen Universität Graz erhoben wurden.

In Kapitel 5 werden in weiterer Folge die Ergebnisse diskutiert und die wichtigsten Aspekte dieser Arbeit zusammengefasst. Abschließend sollen mögliche Ausgangspunkte für zukünftige bzw. weiterführende Arbeiten aufgezeigt werden.

2 Literaturrecherche

2.1 Impfungen bei rheumatoider Arthritis

Als „rheumatoide Arthritis“ (RA) bzw. „chronische Polyarthritis“ bezeichnet man eine Autoimmunerkrankung unbekannter Ätiologie mit einer Prävalenz von ca. 1% im Erwachsenenalter. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 55. und 75. Lebensjahr, wobei sich neben einer Bevorzugung des weiblichen Geschlechtes auch eine familiäre Häufung (d.h. Assoziation zum HLA- Antigen DR4/DRB1 in 70% der Fälle) beobachten lässt. Zu Beginn der Erkrankung wird die Synovialis der Gelenke mit autoreaktiven T-Helferzellen, B- Lymphozyten und Plasmazellen infiltriert; zudem kommt es zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (u.a. IL-1, TNF α), knorpeldestruierenden Enzymen (z.B. Kollagenase) sowie zur Aktivierung des Komplementsystems. Durch den Einfluss von makrophagenähnlichen und fibroblastenähnlichen Zellen (Typ A- Synoviozyten bzw. Typ B- Synoviozyten) resultiert die Ausbildung eines sog. „Pannus“ (d.h. die Verdickung der Synovialis), welcher konsekutiv den Knorpel infiltriert und schließlich zerstört. Dieser Vorgang wird als „Tumor like proliferation“ bezeichnet. Im weiteren Krankheitsverlauf dehnt sich der entzündliche Prozess der Synovialis auf die Gelenke, Sehnenscheiden und Schleimbeutel aus [18].

Rheumatoide Arthritis imponiert als chronisch- entzündliche Systemerkrankung, welche mit unspezifischen Allgemeinsymptomen- Abgeschlagenheit, Myalgien, evtl. subfebrile Temperaturen, usw.- sowie einer symmetrischen Polyarthritis der kleinen Gelenke, vorwiegend der Metacarpophalangeal-, proximalen Interphalangeal- und Grundgelenke von Finger und Zehen, einhergeht. Außerdem kann es zum Auftreten von Tendovaginitiden, Bursitiden sowie Rheumaknoten (letztere in ca. 20% der Fälle) oder auch zu einem Befall von Organen außerhalb des Bewegungsapparates, u.a. von Herz, Lunge, Leber, Augen oder Gefäßen, kommen. Die Erkrankung verläuft chronisch progredient, sodass es unbehandelt zu Gelenkfehlstellungen (z.B. Ulnardeviation der Finger, Knopflochdeformität der Fingermittelgelenke, „Schwanenhalsdeformität“ der Finger, Ankylosierung von Gelenken), irreversibler Gelenksdestruktion und in weiterer Folge zu einer schwerwiegenden Invalidität kommt [18].

Die Diagnosekriterien der rheumatoiden Arthritis gehen auf das American College of Rheumatology (ACR) aus dem Jahre 2010 zurück und berücksichtigen die Anzahl an geschwollenen bzw. druckschmerzhaften Gelenken, die Erkrankungsdauer, bestimmte immunserologische Befunde sowie unspezifische Entzündungsparameter. In Tabelle 1 sind

die ACR- Diagnosekriterien dargestellt [18]. Ab einem Punktwert von ≥ 6 Punkten gilt die Diagnose einer rheumatoiden Arthritis als gesichert. In Bezug auf die immunserologischen Befunde ist allerdings stets zu berücksichtigen, dass positive Rheumafaktoren (RF)- d.h. Autoantikörper gegen das Fc- Fragment („Fragment crystalline“) der IgG- Antikörper- *nicht* spezifisch für das Vorliegen einer RA sind und auch bei chronischen Infektionskrankheiten und bestimmten Kollagenosen sowie bei bis zu 5% der gesunden Bevölkerung positiv ausfallen. Die Sensitivität der Antikörper gegen das cyclische citrullinierte Peptid (anti- CCP- Ak) ist zwar mit jener der Rheumafaktoren vergleichbar; bei einem *gleichzeitigen* Vorliegen von positiven anti- CCP und positiven RF besteht aber eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine aggressive Verlaufsform einer RA [18]. Neben RF und anti- CCP- Ak dienen die unspezifischen Entzündungsparameter BSG (Blutkörperchen- Senkungsgeschwindigkeit) und CRP (C- reaktives Protein) als Index für die Krankheitsaktivität einer rheumatoiden Arthritis. Ferner lassen sich bei RA- Patienten oft zusätzlich eine milde Entzündungsanämie sowie eine leichte Thrombozytose bzw. Leukozytose feststellen. Ergänzend zu den angeführten serologischen Untersuchungen können destruktive Veränderungen an Gelenken und Knorpel bei RA mittels Röntgenaufnahmen, Kontrastmittel- MRT (Magnetresonanztomographie), Arthrosonographie oder Dreiphasen- Szintigraphie nachgewiesen werden [18].

Tabelle 1: ACR- Diagnosekriterien der rheumatoiden Arthritis [18]

Gelenkbeteiligung	≤ 1 großes Gelenk	0 Punkte
	2-10 große Gelenke	1 Punkt
	1- 3 kleine Gelenke	2 Punkte
	4-10 kleine Gelenke	3 Punkte
	>10 , davon mindestens ein kleines Gelenk	5 Punkte
Immunserologie	RF und anti- CCP- Ak negativ	0 Punkte
	RF oder anti- CCP- Ak schwach positiv	2 Punkte
	RF oder anti- CCP- Ak hoch positiv	3 Punkte
Akute- Phase- Reaktion	CRP und BSG normal	0 Punkte
	Erhöhung von CPR oder BSG	1 Punkt
Dauer der Arthritis	<6 Wochen	0 Punkte
	≥ 6 Wochen	1 Punkt
<u><i>Diagnose: Rheumatoide Arthritis, wenn ≥ 6 Punkte erzielt werden</i></u>		

Das Spektrum der verschiedenen Behandlungsmöglichkeiten der rheumatoiden Arthritis beinhaltet neben physikalischer Therapie den Einsatz von Nichtsteroidalen Antirheumatika NSAR (u.a. Ibuprofen, Diclofenac, Naproxen, Celecoxib, Etoricoxib) und immunmodulierenden Medikamenten, u.a. Glukokortikoide, Basistherapeutika¹ und sog. „Biologicals“². In fortgeschrittenen Stadien können zusätzlich chirurgische Interventionsmöglichkeiten, beispielsweise eine operative (Teil-) Entfernung der Synovialis (totale oder partielle Synovektomie) oder ein prothetischer Gelenksersatz, zum Einsatz kommen [18].

Autoimmunerkrankungen gehen mit einer ungefähr doppelt so hohen Anfälligkeit für bakterielle und/ oder virale Infektionen im Vergleich zur Normalbevölkerung einher [1] [2]. Infektionen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) betreffen in erster Linie den Bewegungsapparat, die Haut und Weichteile sowie den Atmungstrakt [1]. Bei Patienten mit chronisch entzündlichen oder Autoimmunerkrankungen *ohne* Arthritis kommen Infektionen des Respirationstraktes am häufigsten vor [1]. Nicht nur die zugrundeliegende Autoimmunerkrankung an sich, welche durch eine gestörte Regulation des Immunsystems gekennzeichnet ist, sondern auch der Einsatz einer immunmodulierenden Therapie zur Kontrolle des Krankheitsprozesses sowie zur Prophylaxe von möglichen Komplikationen im Krankheitsverlauf, liegen dem erhöhten Infektionsrisiko zugrunde [1] [3]. Allerdings ist es nahezu unmöglich, den jeweiligen Anteil des durch die Grunderkrankung an sich bedingten Infektionsrisikos einerseits von dem Ausmaß des Therapie- assoziierten Infektionsrisikos andererseits abzugrenzen [6]. Als prädisponierende Faktoren für schwere Infektionen der Atemwege bei RA gelten höheres Alter, ein extrartikulärer Befall, eine positive Immunserologie, die Einnahme von oralen Steroiden und das Vorliegen von zusätzlichen Komorbiditäten [6] [18].

Einer Vielzahl an Infektionen kann anhand von entsprechenden Impfungen effektiv vorgebeugt werden [1] [4]. Da immunsupprimierte Personen besonders anfällig für Infektionen sind, gibt es zahlreiche Empfehlungen, z.B. der Ständigen Impfkommission des Robert Koch Institutes, zur Durchführung von Schutzimpfungen, u.a. gegen Pneumokokken und Influenza [1] [3] [5]. Allerdings schränken Sorgen um die Sicherheit und Befürchtungen um eine verminderte Immunogenität der Impfstoffe die Verwendung derselben bei diesen Personen ein [2]. Impfgegner verweisen auf Berichte, denen zufolge

¹ Zu den Basistherapeutika zählen u.a. Methotrexat, Azathioprin, Ciclosporin A, Leflunomid, Cyclophosphamid, Sulfasalazin und Hydroxychloroquin [18].

² Zu den „Biologicals“ gehören u.a. TNF α - Inhibitoren, Rituximab, Abatacept und Tocilizumab [18].

bei zuvor gesunden Personen nach erfolgter Impfung rheumatische Erkrankungen ausgebrochen wären; aber ein kausaler Zusammenhang zwischen diesen Ereignissen wurde nie bestätigt [2]. Impfungen könnten *theoretisch* durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (als Immunantwort auf die Exposition mit dem Impfstoff) bzw. durch molekulares Mimikry bestehende Autoimmunerkrankungen verschlimmern oder aber auch deren Entstehung triggern [1] [4]. Obwohl einige Case Reports einen Zusammenhang zwischen Impfungen und Induktion bzw. Exazerbation von Autoimmunerkrankungen aufweisen, konnten diese Ergebnisse weder in prospektiven Studien noch in kontrollierten Case- Control- Studien bestätigt werden [1].

Allerdings ist bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie eine *eingeschränkte Immunantwort* gegen bestimmte Impfstoffe durchaus möglich [1] [3] [4], wobei üblicherweise die gemessenen Antikörpertiter nach erfolgter Impfung dennoch einen ausreichenden Schutz für die Mehrzahl der geimpften Personen darzustellen scheinen [1] [4]. Zudem zeigen Patienten unter einer kontinuierlichen immunsuppressiven Therapie eine verkürzte Dauer der protektiven Immunantwort [3]. Es ist unklar, wie lange protektive Antikörpertiter nach einer Pneumokokken- Impfung bei Patienten mit immunsuppressiver Therapie anhalten und in welchem Intervall Auffrischungsimpfungen bei diesen Personen stattfinden sollten [1]. Insbesondere Methotrexat (MTX) scheint den Erfolg der Pneumokokken- Impfung zu beeinträchtigen [3]; außerdem wurde eine verringerte Immunantwort nach einer Influenza- Impfung bei Patienten unter einer Therapie mit Mycophenolat mofetil, Cyclosporin und Azathioprin beobachtet [3]. Andere Studien weisen darauf hin, dass TNF α - Antagonisten hingegen kaum beeinträchtigende Auswirkungen auf die Effektivität einer Impfung gegen Pneumokokken und Influenza ausüben [2] [3]. Das Vorgehen hinsichtlich Impfstrategien bei Patienten, bei denen ein Therapiebeginn mit Rituximab (RTX) bzw. Abatacept geplant ist, ist umstritten [3]. Die zahlreichen Aspekte rund um das Thema Impfungen bei supprimiertem Immunsystem werden im Kapitel 2.4 „Pneumokokken- Impfung und Immunsuppression“ auf S.36ff. bzw. im Kapitel 2.5 „Vergleich mit anderen Impfstoffen“ auf S.47ff. erörtert.

Trotz der Möglichkeit einer inadäquaten Immunreaktion, v.a. bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie, erweisen sich Impfungen gegen Influenza und Pneumokokken bei Patienten mit RA als sicher und in den meisten Fällen auch als immunogen [2]. Obwohl antirheumatische Therapiestrategien in der Lage sein könnten, die Immunantwort zu beeinträchtigen, sollte man diesen Patienten dennoch adäquate Impfungen zukommen lassen [4] [19]. Gemäß Kavanaugh [4] sollte bei Personen unter

immunsuppressiver Therapie nicht aus Sorge um das Ausmaß der nachfolgenden Immunantwort auf eine Impfung verzichtet werden. Der Gebrauch der Mehrzahl an Impfstoffen bei Patienten mit chronisch rheumatischen oder Autoimmunerkrankungen, v.a. gegen Influenza und Pneumokokken, sei durchaus gerechtfertigt [1]. In Anbetracht der potentiell gestörten Produktion an Antikörpern, sollten aber- wenn möglich- adäquate Impfungen bereits vor Therapiebeginn mit immunmodulierenden Medikamenten stattfinden, um dieses Problem bereits von Anfang an zu vermeiden [4]. Auch wäre in bestimmten Fällen eine Unterbrechung der immunsuppressiven Therapie denkbar, um eine bestimmte Schutzimpfung vornehmen zu können. Falls dies nicht realisierbar sein sollte, könnten andere Strategien angewandt werden, wie z.B. wiederholte Impfungen oder die Verwendung höherer Dosen an Antigenen; wobei diese Möglichkeiten aber in bisherigen Studien noch nicht näher untersucht wurden [4].

Es hat sich gezeigt, dass die Impfungsrate gegen Influenza und Pneumokokken bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie suboptimal ist [5] und die Impfkampagnen für diese Hochrisikogruppen besser in die Praxis umgesetzt werden sollten [1]. So wurden z.B. in einer rheumatologischen Klinik 101 ambulante Patienten unter einer Therapie mit Basistherapeutika, sog. „Disease modifying antirheumatic drugs“ (DMARDs) dahingehend untersucht mit dem Ergebnis, dass diese seltener als andere Risikopatienten gegen Pneumokokken und Influenza geimpft waren, obwohl das Bewusstsein um die erforderlichen Impfungen bei den rheumatologischen Patienten hoch war [5]. Ähnliche Ergebnisse liefern die Untersuchungen von Feuchtenberger et al. [20]: Das Impfbewusstsein und die Impfungsrate gegen Pneumokokken zeigten sich bei 301 Patienten mit RA stark abhängig von dem zugrundeliegenden Therapieregimen. So waren Personen unter einer Therapie mit TNF α - Antagonisten und Rituximab sich des erhöhten Infektionsrisikos deutlicher bewusst und auch öfter gegen Pneumokokken geimpft als jene Personen unter einer Therapie mit traditionellen DMARDs; trotzdem wurde bei allen 301 Patienten eine deutliche Diskrepanz zwischen dem Bewusstsein um die erforderlichen Impfungen und der Anzahl an tatsächlich durchgeführten Impfungen, unabhängig von den jeweiligen Therapieregimen, ersichtlich [20].

Generell werden schätzungsweise höchstens 30- 40% der Hochrisiko- Patienten routinemäßig gegen Pneumokokken und Influenza geimpft [1]. Um die Impfraten bei diesen Risikopatienten zu erhöhen, sind neben einer verstärkten Bewusstseinsförderung der Patienten zusätzliche Strategien, wie etwa eine verbesserte allgemeinmedizinische

Basisversorgung oder die Einführung obligatorischer Impfungen gegen Pneumokokken vor Beginn einer Behandlung mit immunsupprimierenden Medikamenten erforderlich [5].

2.2 ELISpot als Evaluierungsmethode für die Wirksamkeit von Impfstoffen

Die Wirksamkeit von (neuen) Impfstoffen bzw. Immuntherapien kann mittels quantitativer Messungen der zellulären (und humoralen) Immunantwort beurteilt werden [9]. In diesem Zusammenhang hat sich die Methodik des „Enzyme-linked immunosorbent Spot“ (ELISpot) in den letzten 25 Jahren zur Standard- Evaluierungsmethode klinischer Studien, die sich u.a. mit der Entwicklung von humanen Impfstoffen befassen, entwickelt. Ferner werden ELISpot- Assays zur Diagnostik bzw. Abklärung von vielen verschiedenen (Infektions-) Erkrankungen, wie z.B. HIV, Malaria oder Tuberkulose, aber auch im Rahmen von Karzinomstudien eingesetzt [10].

ELISpot- Assays eignen sich zur Analyse der vielfältigen und spezifischen Funktionen sowohl der B- als auch der T- Lymphozyten [10]. Ursprünglich wurden ELISpot- Assays zum Nachweis von Antikörper- produzierenden B- Zellen entwickelt; mit steigender Testsensitivität wurde im Laufe der Zeit zusätzlich die quantitative Erfassung der in weit geringerer Konzentration von T- Zellen sezernierten Zytokine und Chemokine ermöglicht [21]. Diese Arbeit beschränkt sich auf die funktionelle Analyse der T- Lymphozyten und den Nachweis der Zytokine $IFN\gamma$ und IL-2.

Im Gegensatz zur Messung der B- Zell- vermittelten Immunität, die auf der Bestimmung von Antikörpern in Körperflüssigkeiten basiert, werden zur Messung der T- Zell- medierten Immunantwort lebende Zellen in funktionellen Assays ex vivo benötigt [22]. ELISpot- Assays zählen zu den wichtigsten Immunoassays zur Erfassung von humanen Antigen- spezifischen T- Zellen [10] und stellen eine sensible Technik zur Beurteilung Zytokin- produzierender Zellen auf dem Niveau einer einzelnen Zelle dar. Die Methodik ist schnell durchführbar, liefert reproduzierbare Ergebnisse und weist eine sehr niedrige Nachweisgrenze für die Sekretion von vielen unterschiedlichen Zytokinen, vor allem von $IFN\gamma$, Granzym B, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, sowie von TNF α und TGF- β 1 auf [9] [10]. Das $IFN\gamma$ - Immunoassay gilt unter den zahlreichen Arten der ELISpot- Technik zur Messung der spezifischen Funktionen der T- Lymphozyten als Standardmethode. Granzym B wird hauptsächlich von CD8- positiven Zellen und natürlichen Killerzellen produziert, sodass der Nachweis von diesem Zytokin im Vergleich

zu IFN γ ein direkteres Maß für die Aktivität der zytotoxischen Zellen darstellt. Im Gegensatz zu den angeführten Zytokinen werden u.a. IL-13 oder IL-15 von den Antigen-spezifischen T- Lymphozyten in einer weit geringeren Konzentration sezerniert, wodurch hier die Nachweisgrenze der ELISpot- Methode an ihre Grenzen stößt [10].

Das Grundprinzip der ELISpot- Assays sieht wie folgt aus: Durch den Einsatz von zwei hochaffinen Antikörpern, die gegen verschiedene Epitope an einem einzelnen Zytokin bzw. Chemokin gerichtet sind, entsteht ein Antikörper- Antigen- Antikörper- Komplex [21]. Der erste Antikörper mit der höchsten Affinität, sog. „Coating antibody“, ist dabei an eine feste Matrix bzw. Phase- spezielle Mikrotiterplatten bzw. PVDF- Platten³ mit je 96 Tüpfeln bzw. Vertiefungen (sog. „Wells“- gebunden. Die in der zu analysierenden Probe enthaltenen und vorab mit einem spezifischen Antigen (vor)stimulierten Zytokin-sezernierenden Zellen werden zusammen mit dem an die PVDF- Platte gebundenen spezifischen Antikörper für eine gewisse Zeitspanne inkubiert, sodass die Zytokine (bzw. Chemokine) in unmittelbarer Nähe der sezernierenden Zellen eine Bindung mit dem Antikörper eingehen können [21]. Anschließend wird ein zweiter Antikörper, sog. „Detection antibody“, hinzugefügt, der im Gegensatz zum ersten Antikörper ein anderes Epitop des Antigens erkennt und bindet. Zusätzlich ist an das Ende des zweiten Antikörpers ein Enzym gekoppelt (daher auch der Name „*Enzyme- linked immunosorbent spot*“), welches mit einem adäquaten chromogenen Substrat- u.a. HRP („Horseradish peroxidase“, Meerrettichperoxidase) oder AP (alkalische Phosphatase)- eine Reaktion eingeht, die in der Ausbildung von sog. „Spots“, also farbigen Punkten, resultiert. Diese permanenten farbigen Punkte kennzeichnen die einzelne Position der Zytokin-sezernierenden Zelle und werden anschließend mikroskopisch oder elektronisch ausgewertet. Durch wiederholte Waschschritte zwischen den einzelnen Arbeitsschritten im gesamten Ablauf des Verfahrens werden nicht gebundene bzw. überschüssige Anteile entfernt und das Auftreten von störenden Hintergrundsignalen bzw. unspezifischen Reaktionen vermieden [21]. In Abbildung 1 „Grundprinzip der ELISpot- Technik“ ist der technische Ablauf dieses Verfahrens graphisch dargestellt.

Zur Durchführung von ELISpot- Immunoassays ist neben einer akkuraten Arbeitsweise eine kritische Auswertung der erhobenen Daten erforderlich, da vielfältige Faktoren das Resultat beeinflussen bzw. auch verfälschen können. Daher ist ein standardisiertes Vorgehen in Bezug auf technischen Ablauf und Datenanalyse von besonderer Bedeutung, sodass auch nicht routiniertes Personal dazu in der Lage ist, korrekte Messwerte zu

³ Die Abkürzung PVDF steht für „Polyvinylidenfluorid“ [17].

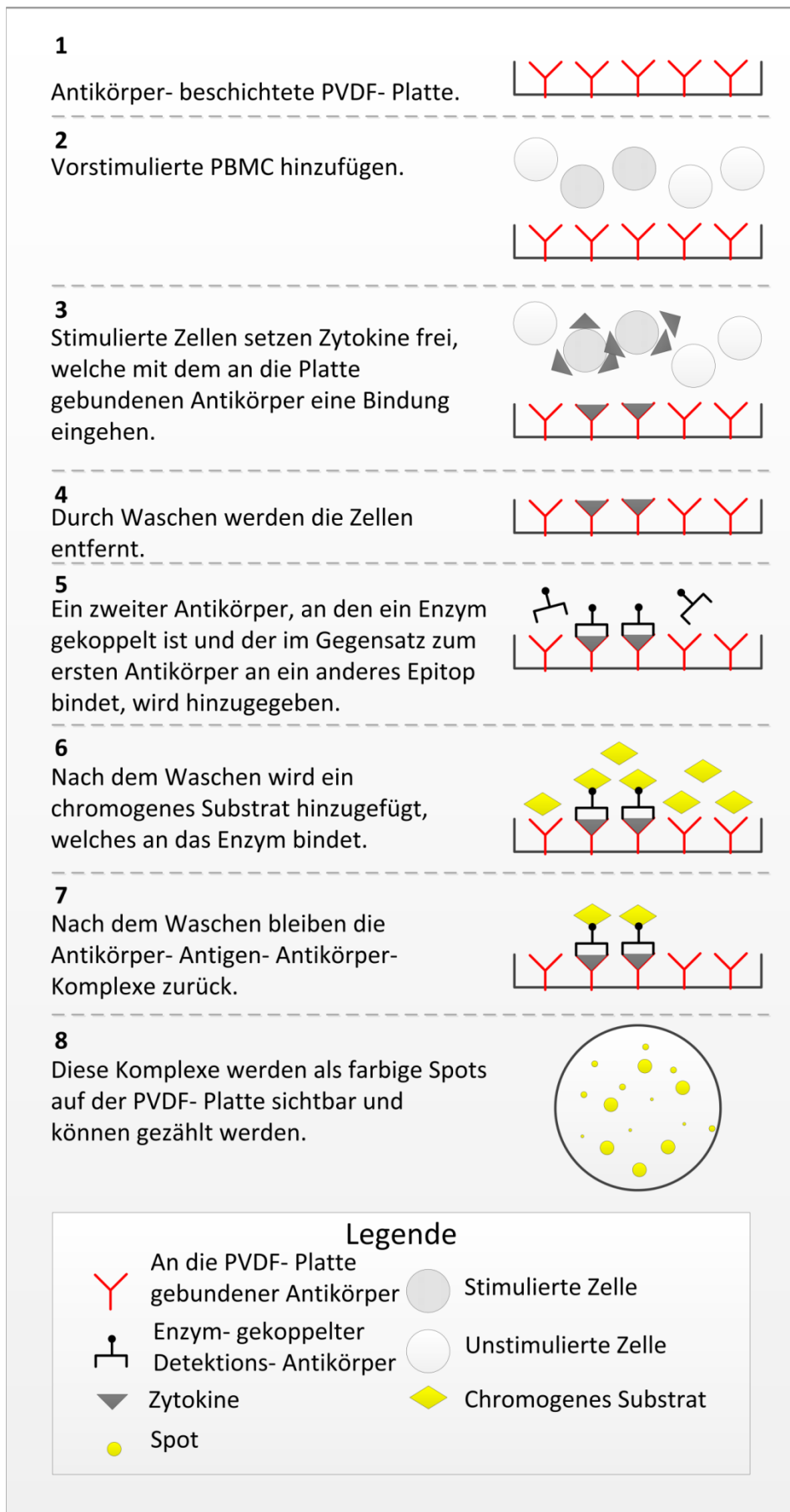
erheben [22]. So konnten z.B. in einer Studie acht von elf neue Laborangestellte anhand eines standardisierten IFN γ - ELISpot- Protokolls bereits beim ersten Versuch die Antigen-spezifischen CD8- positiven T- Zellen nach vorhergehender Stimulation mit einem CMV- Peptid (CMV= Cytomegalievirus) ermitteln, wobei sich alle erhobenen Messwerte innerhalb der vorgegebenen Zielwerte des Referenz- Labors befanden [22].

Prinzipiell unterscheidet man zwei Arten von ELISpot- Assays, nämlich einerseits traditionelle „Single- Color“- ELISpot- Assays und andererseits sog. „Dual- Color- ELISpot- Assays“. So z.B. stellt der sog. „*T-SPOT.TB*TM“ (Oxford Immunotec) [16] eine vereinfachte Variante der konventionellen Single- Color- ELISpot- Technik dar und dient bei Patienten mit Verdacht auf eine akute Tuberkuloseinfektion bzw. latente tuberkulöse Infektion (LTBI)⁴ mittels in vitro Stimulation mit Mycobacterium tuberculosis- spezifischen Antigenen zum Nachweis von IFN γ - sezernierenden T- Effektorzellen [16]. Beim *T-SPOT.TB*TM werden im Gegensatz zur „konventionellen“ ELISpot-Technik die isolierten PBMC („Peripheral blood mononuclear cells“) nicht bereits vor der Inkubation mit den an die PVDF- Platte gebundenen Coating- Antikörpern separat mit den Antigenen (vor)stimuliert, sondern die Exposition der PBMC mit den Antigenen erfolgt direkt in den Wells der Antikörper- beschichteten Mikrotiterplatte [16].

Die Technik des Dual- Color- ELISpot- Assays weist im Gegensatz zu klassischen („Mono“-) ELISpot- Assays den Vorteil auf, in einem einzigen Testverfahren gleichzeitig die Sekretion von jeweils zwei verschiedenen Zytokinen, z.B. von IFN γ und IL-2, messen zu können, wodurch nicht nur die Aussagekraft eines einzelnen Immunoassays erhöht, sondern auch der Zeitaufwand für die technische Durchführung minimiert wird [17]. Zudem weisen einige Studien darauf hin, dass die mithilfe eines Dual- Color- ELISpot- Assays erstellten Zytokinprofile (mono- und polyfunktionelle T- Lymphozyten) eine Unterscheidung zwischen Primärantwort, d.h. Stimulation von naiven T- Zellen, und Sekundärantwort, also Stimulation von Memory- T- Zellen, ermöglichen, wodurch u.a. die Wirksamkeit von Impfungen besser eingeschätzt bzw. evaluiert werden kann [12] [13] [14]. Näheres dazu ist im Kapitel 2.3.3 „T- Zell- Stimulation und Zytokinexpression“ auf S. 20ff. angeführt.

⁴ Eine latente Tuberkuloseinfektion ist gekennzeichnet durch eine asymptomatische Klinik, einen fehlenden radiologischen Nachweis eines Organbefundes, aber einen positiven Tuberkulin- Hauttest bzw. ein positives IFN γ - Release- Assay [18]

Abbildung 1: Grundprinzip der ELISpot- Technik, modifiziert nach [23]



2.3 Pneumokokken- Impfstoffe

2.3.1 Einführung

Streptococcus pneumoniae ruft verschiedene schwerwiegende Erkrankungen, die sich u.a. als Pneumonie, Meningitis oder Sepsis manifestieren können, hervor und geht weltweit mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher [24] [25]. Pneumokokken sind bei Erwachsenen hauptverantwortlich für das Auftreten von ambulant erworbenen Pneumonien, sog. „Community acquired pneumonia“ (CAP), gefolgt von *Haemophilus influenzae* und *Chlamydia pneumoniae*, welche jeweils für ca. 10% der Fälle verantwortlich gemacht werden können. Bei immunsupprimierten Patienten wird das Erregerspektrum der CAP zusätzlich durch opportunistische Keime, nämlich Viren (z.B. Herpes simplex Virus oder Zytomegalievirus), Pilze, *Pneumocystis jiroveci* oder auch durch atypische bzw. seltene Erreger (beispielsweise *Mycoplasma pneumoniae* oder *Legionella species*) erweitert [18].

Bisher wurden 92 verschiedene Pneumokokken- Serotypen bzw. Pneumokokken- Stämme beschrieben, wobei jeder einzelne davon über eine spezielle Kapsel aus Polysacchariden verfügt, welche den Erregern eine gewisse Fähigkeit zur Immunescape verleiht [25]. Durch das Vorhandensein der Kapsel kann die Ablagerung von Komplement (C_3) an der bakteriellen Oberfläche verhindert und damit die (Opsono-) Phagozytose blockiert werden [24]. Außerdem unterscheiden sich die verschiedenen Pneumokokken- Stämme hinsichtlich Prävalenz, nasopharyngealer Kolonisation, Invasivität, Pathogenität und Antibiotika- Resistenz [24] [25]. So sind z.B. die Serotypen 6B und 23F vorwiegend mit einer nasopharyngealen Kolonisation assoziiert, während die Serotypen 1 und 5 meist mit einem schweren Krankheitsverlauf einhergehen [24]. Die Virulenz der Pneumokokken ist abhängig sowohl vom Genotyp als auch von der Kapselstruktur- wobei sich gezeigt hat, dass die Polysaccharid- Kapsel den Haupt- Virulenzfaktor des Pathogens darstellt, zumal nackte Erreger (d.h. ohne Kapsel) nur selten schwere Erkrankungen hervorrufen [24]. In Abhängigkeit vom jeweiligen Typ der Kapsel können somit dieselben Pneumokokken- Proteine, wie z.B. Pneumolysin, Pneumococcal surface Protein A oder C, in unterschiedlichem Ausmaß den Grad der Virulenz mitbeeinflussen [24]. Die Dicke der jeweiligen Kapsel bedingt die Pathogenität der Pneumokokken und ihr invasives Potential korreliert invers mit ihrer Fähigkeit zur Kolonisation [25].

Der Schweregrad einer Infektion mit Pneumokokken zeigt sich stark altersabhängig, wobei insbesondere Kinder und ältere Menschen betroffen sind. Zudem spielen ein niedriger

sozioökonomischer Status, bestimmte Komorbiditäten, ein supprimiertes Immunsystem und der zugrundeliegende Serotyp der Pneumokokken- Infektion eine entscheidende Rolle für die Prognose [25]. Letzterer determiniert in entscheidendem Ausmaß das Outcome einer bakteriellen Pneumonie, wobei diese Unterschiede hinsichtlich der Pneumokokken- Stämme bei einer bakteriellen Meningitis weit geringer ausfallen [25].

Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) sind- wie bereits erwähnt- einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt, wobei- neben Bewegungsapparat und Weichteilen- auch häufig der Respirationstrakt befallen ist. Daher nimmt bei diesen Patienten u.a. eine Impfung gegen Pneumokokken einen hohen Stellenwert ein [1].

Man unterscheidet zwei Arten von Pneumokokken- Impfstoffen: Einerseits reine, *Polysaccharid- basierte Impfstoffe* und andererseits *konjugierte Impfstoffe*. Bei Letzteren sind die Pneumokokken- Polysaccharide an das Diphtherie- Trägerprotein CRM₁₉₇, eine nicht- toxische Variante des Diphtherie-Toxins, gekoppelt [1] [26] [27]. Während die Verabreichung von konjugierten Pneumokokken- Impfstoffen Kindern unter zwei Jahren vorbehalten ist, werden zur Immunisierung von Erwachsenen über 65 Jahren reine Polysaccharid- basierte Pneumokokken- Impfstoffe verwendet. Der im klinischen Bereich verwendete 23- valente Polysaccharid- Impfstoff (Pneumovax®) enthält freie, hoch gereinigte 23 der bisher 92 identifizierten kapsulären Pneumokokken- Polysaccharide⁵, welche insgesamt für ca. 88% aller Infektionen mit Pneumokokken im Erwachsenenalter verantwortlich sind [1] [26] [28]. Es hat sich gezeigt, dass schwere Infektionen im Kindesalter im Vergleich zum Erwachsenenalter durch andere Pneumokokken- Stämme hervorrufen werden, sodass dementsprechend auch die Pneumokokken- Impfstoffe für Kinder eine andere Zusammensetzung als jene für Erwachsene aufweisen [1] [26] [27] [28] [29] [30]. Die konjugierten Impfstoffe der ersten Generation für Kinder enthalten sieben Pneumokokken- Polysaccharide⁶ (Prevenar®), welche an das Trägerprotein CRM₁₉₇ gekoppelt sind [1] [26] [27] [28] [29] [30]; um einen erweiterten Impfschutz für Kinder garantieren zu können, enthält ein neu entwickelter 13- valenter konjugierter Impfstoff zusätzlich zu den im ursprünglichen (7- valenten) konjugierten Impfstoff enthaltenen sechs weitere Polysaccharide (der Serotypen 1, 3, 5, 6A, 7F und 19A) und soll somit zur Prophylaxe von über 90% aller schweren Infektionen mit Pneumokokken im Kindesalter

⁵ Dieser Impfstoff enthält Polysaccharide folgender Serotypen: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F und 33F [28].

⁶ Dieser konjugierte Impfstoff enthält Polysaccharide folgender Serotypen: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F [28] [29].

beitragen [30]. In dieser Arbeit wird exemplarisch für die Gruppe der konjugierten Pneumokokken- Impfstoffe vorwiegend *der 7- valente konjugierte Impfstoff* in Betracht gezogen, da er auf demselben Grundprinzip beruht und diesbezüglich u.a. mehr Studien und somit auch mehr Erfahrungswerte vorliegen.

Trotz verfügbarer Impfstoffe gegen Pneumokokken wird die Effektivität der aktuellen Impfkampagnen zunehmend durch das vermehrte Auftreten von Antibiotika- resistenten Pneumokokken gefährdet [29] [31]. Zudem steigt die Wahrscheinlichkeit für ein sog. „Replacement“ an, d.h. diejenigen Pneumokokken- Serotypen, welche durch aktuell verfügbare Impfstoffe abgedeckt sind, werden zunehmend durch mutierte Pneumokokken- Stämme ersetzt [26] [29] [32]. Daher wird die Notwendigkeit, neue Impf- Strategien zu entwickeln, um einen effizienten Schutz vor schweren Pneumokokken- Infektionen garantieren zu können, immer wichtiger [32] [33] [34] [35]. Aus diesem Grund befassen sich zahlreiche Studien mit der Entwicklung neuer Pneumokokken- Impfstoffe. So z.B. haben Wuorimaa et al. [36] einen 11- valenten Pneumokokken- Polysaccharid-Impfstoff, der sowohl mit Tetanus- als auch mit Diphtherie- Trägerproteinen konjugiert und mit einem Aluminium- Adjuvant versetzt ist, an 30 Erwachsenen getestet und Jakobsen et al. [37] die Wirkung des sog. „Pnc1-TT“- Impfstoffes, bei dem Pneumokokken- Polysaccharide an ein Tetanus- Protein gekoppelt sind, in einem Mausexperiment untersucht. In beiden Fällen hat sich bestätigt, dass die Konjugation des reinen Polysaccharid- Impfstoffes an einen Polypeptid- Carrier zu einer besseren Immunogenität führt, wobei allerdings altersabhängige Unterschiede in der Immunantwort festgestellt werden konnten [36] [37]. Näheres dazu ist im Kapitel 2.3.4 „Immunantwort bei Neugeborenen und Kindern“ auf Seite 32f. angeführt.

Außerdem werden gewisse Oberflächenproteine der Pneumokokken als mögliche Ausgangspunkte für neue Impfstoffe erforscht. So gelten beispielsweise die Proteine Pneumococcal surface Protein A (PspA), Pneumolysin (Ply), Choline- binding Protein A (CbpA) und Pneumococcal surface Antigen Protein A (PsaA) als vielversprechende Kandidaten für eine neue Generation an Impfstoffen bei Kindern [34] [38] [39] [40]. Schmid et al. [33] haben zudem die Immunantwort auf den experimentellen Protein- basierten Impfstoff „IC47“, bestehend aus den Pneumokokken- Antigenen PcsB (Streptococcal Protein required for Cell Separation B), StkP (Serin/Threonin Protein Kinase) und PsaA an 108 Erwachsenen verschiedener Altersgruppen untersucht. Besonders *Pneumococcal surface Protein A (PspA)* sticht in diesem Zusammenhang als potentes Antigen hervor [31] [34] [35]. Das Zellwand-assozierte Oberflächenprotein PspA stellt

einen wichtigen Virulenzfaktor der Pneumokokken dar, da es in der Lage ist, menschliches Laktoferrin zu binden und die Ablagerung von Komplement auf der Oberfläche der Bakterien zu verhindern [31] [34]. Pneumococcal surface Antigen Protein A (PsaA) spielt im Gegensatz dazu eine wichtige Rolle bei der Besiedelung von Schleimhäuten [34]. Choline- binding Protein A (CbpA)⁷ wird an der Oberfläche der Pneumokokken exprimiert und fungiert als Adhäsion [38].

Die angeführten Proteine stellen Bestandteile *sämtlicher* Pneumokokken- Serotypen dar, weshalb eine Protein- basierte Impfung möglicherweise einen besseren Schutz vor einer schweren Infektion mit Pneumokokken bieten könnte als reine Polysaccharid- basierte Impfstoffe dazu in der Lage sind [34].

2.3.2 Eigenschaften und Wirkung

An dieser Stelle sollen die unterschiedlichen Eigenschaften und Wirkmechanismen rein Polysaccharid- basierter Pneumokokken- Impfstoffe einerseits und konjugierter Pneumokokken- Impfstoffe andererseits miteinander verglichen werden.

Pneumokokken- Polysaccharide besitzen kaum immunogene Eigenschaften, v.a. bei supprimiertem Immunsystem [27] und auch bei Kindern, wobei letzteres wahrscheinlich auf die Unreife des kindlichen Immunsystems zurückzuführen ist [28] [34]. Die Unterschiede zwischen infantilem und adulten Immunsystem in Bezug auf T- Zellstimulation und Zytokinsekretion werden in Kapitel 2.3.4 „Immunantwort bei Neugeborenen und Kindern“ auf S.32ff behandelt. Reine Polysaccharid- basierte Impfstoffe sind kaum in der Lage, effektiv vor einer schweren Infektion mit Pneumokokken zu schützen [26] [31] [34] [41], da sie eine primäre B- Zell- abhängige (und somit T- Zell- *unabhängige*) Immunantwort induzieren [26] [31] [41]. Die stimulierten Antikörper- Titer bleiben ungefähr ein bis zwei Jahre stabil, bevor sie nach ca. fünf Jahren allmählich völlig nachlassen und somit schwindet auch die Wirksamkeit des Impfstoffes. Obwohl der 23- valente Polysaccharid- Impfstoff unfähig scheint, effektive Antikörper- Spiegel langfristig aufrecht zu erhalten, ist eine routinemäßige Auffrischungsimpfung aber nicht empfohlen, da eine immunologische Hyporeaktivität nach wiederholter Verabreichung zu erwarten ist [27] [28].

⁷ Choline- binding Protein A wird auch „Pneumococcal surface Protein C“ (PspC) oder „Streptococcus pneumoniae secretory Immunoglobulin A binding Protein“ (SpsA) genannt [38].

Zahlreiche Studien verdeutlichen, dass die Konjugation bzw. kovalente Bindung von freien Pneumokokken- Polysacchariden mit einem hoch immunogenen Polypeptid- Carrier, wie z.B. dem Diphtherie- Carrier Protein CRM₁₉₇, eine der klassischen T- Zell- abhängigen ähnliche Immunantwort zur Folge hat, die sich in einer höheren Antikörper- Produktion, besseren Stimulation von Gedächtniszellen sowie einer Priming- bzw. Boost- Funktion für eine nachfolgende Antigenexposition äußert [26] [27] [28] [31] [36] [41]. Die Memory- T- Zell- Antwort, die durch das Trägerprotein induziert wird, unterstützt die Polysaccharid- spezifische B- Zell- Antwort und gilt somit als Schlüsselfaktor in der Entwicklung einer langlebigen Immunität [42].

Wuorimaa et al. [36] haben die zelluläre Immunantwort nach separater in vitro Stimulation einerseits mit den Polysaccharid- Bestandteilen sowie andererseits mit den Proteinkomponenten eines 11- valenten konjugierten Impfstoffes untersucht und festgestellt, dass die Protein- Bestandteile (Tetanus- und Diphtherie- Derivate) als Hauptstimuli für Lymphozytenproliferation und Zytokinexpression dienen, nicht aber die Polysaccharid- Komponenten. Die Exposition mit den Tetanus- und Diphtherie- Antigenen, nicht aber mit den Polysacchariden, führt zu einer erhöhten Proliferationsrate und einer erhöhten Sekretion des Zytokins Interleukin 5 (IL-5). Rabian et al. [27] kommen zu einem ähnlichen Ergebnis: Die Verabreichung des mit dem Carrierprotein CRM₁₉₇ konjugierten Impfstoffes induziert sowohl höhere Antigen-spezifische Proliferationsraten als auch eine höhere Zytokinsekretion, während die Exposition mit Pneumokokken- Polysacchariden nur geringe Effekte hinsichtlich Antikörperproduktion nach sich zieht.

Seit der Einführung des 7- valenten konjugierten Impfstoffes gegen Pneumokokken im Jahre 2000 in den USA (bzw. im Jahre 2001 in Europa) wurde ein dramatischer Rückgang in der Inzidenz schwerer Erkrankungen bei Neugeborenen und Kindern beobachtet [1] [28] [29]. Der konjugierte Impfstoff könnte auch bei Erwachsenen zu einem effektiven Schutz vor einer Pneumokokken- Infektion beitragen [29], zumal Erwachsene ohne Impfschutz von der routinemäßigen Impfung der Kinder profitieren, was wahrscheinlich auf die verminderte Transmission des Erregers von Kindern auf Erwachsene zurückzuführen ist [29]. Kinder stellen nämlich ein Reservoir an Pneumokokken dar und enger Kontakt mit kleinen Kindern im Haushalt gilt als Risikofaktor für die Entwicklung einer schweren Erkrankung bei Erwachsenen. Außerdem ist die Anzahl an asymptomatischen Trägern von Pneumokokken im Nasen-Rachenraum bei Erwachsenen mit Kontakt zu kleinen Kindern höher als im Vergleich zu kinderlosen Erwachsenen [29]. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass jeder Polysaccharid- Bestandteil des 7- valenten konjugierten Impfstoffes

eine unterschiedliche Immunogenität aufweist - trotz Koppelung an das jeweils idente Carrierprotein CRM₁₉₇ [43]: Der konjugierte Impfstoff induziert statistisch signifikante Unterschiede an Serotyp- spezifischen Antikörpertitern, trotz vergleichbarer T- Zell-Rekrutierung durch CRM₁₉₇ und vergleichbarer Sekretion von Interleukin 2 (IL-2), IL-5, IL-6, IL-10 und Interferon γ [43].

Aufbauend auf den fulminanten Fortschritten der Impfkampagnen bei Neugeborenen und Kindern haben einige Studien untersucht, ob der 7-valente konjugierte Pneumokokken-Impfstoff, der eigentlich nur im pädiatrischen Bereich zugelassen ist, auch positive Auswirkungen auf die Immunantwort von Erwachsenen haben könnte. De Roux et al. [28] haben die sequentielle Gabe des konjugierten und des Polysaccharid- Impfstoffes an Erwachsenen im Alter von 70 Jahren und älter untersucht. Eine initiale Verabreichung des konjugierten Pneumokokken- Impfstoffes, gefolgt von einer Verabreichung einer Dosis des Polysaccharid- Impfstoffes ein Jahr später, führt zu einer eindeutig verbesserten Immunantwort, d.h. zu einer zwei- bis dreifach höheren Produktion an IgG- Antikörpern, als die Gabe der zwei Impfstoffe in umgekehrter Reihenfolge [28]. Die Verabreichung des Polysaccharid- Impfstoffes als Erstdosis führte zu einer Depletion der Polysaccharid-spezifischen Gedächtniszellen und zu einer Hyporeaktivität bei Exposition mit dem konjugierten Impfstoff nach einem Jahr. Die beste Immunantwort gegen die meisten Pneumokokken- Serotypen wurde bei den Personen beobachtet, denen zwei Dosen des konjugierten Impfstoffes im Abstand von einem Jahr verabreicht wurden, die schlechteste bei den Studienteilnehmern mit der Gabe des Polysaccharid-, gefolgt von dem konjugierten Impfstoff. Die Autoren haben aus Sorge um potentielle Nebenwirkungen bewusst darauf verzichtet, zwei Dosen des Polysaccharid- basierten Impfstoffes im Abstand von einem Jahr zu verabreichen, was natürlich einen direkten Vergleich der zwei Impfstoffe ermöglicht hätte [28].

Ähnliche Ergebnisse liefern Rabian et al. [27], welche die Verabreichung des 7-valenten konjugierten Impfstoffes gegen Pneumokokken, gefolgt von einer Injektion mit dem 23-valenten Polysaccharid- Impfstoff nach einem vierwöchigen Intervall, mit der einmaligen Gabe des reinen Polysaccharid- Impfstoffes bei 212 HIV- infizierten Erwachsenen verglichen haben. Diese Studie verdeutlicht, dass Patienten mit einer HIV- Infektion signifikante Immunantworten gegen das Carrier-Protein CRM₁₉₇ des 7-valenten konjugierten Impfstoffes entwickeln können. Die Kombination von konjugiertem und Polysaccharid- Impfstoff führt zu einer höheren Produktion an IgG- Antikörpern,

Interferon γ und Interleukin 2 sowie zu einer verstärkten Lymphozytenproliferation im Vergleich zur Einzelverabreichung des reinen Polysaccharid- basierten Impfstoffes [27].

Im Gegensatz dazu stellen Baxendale et al. [44] fest, dass die Zusammensetzung des Pneumokokken- Impfstoffes keinerlei Auswirkungen auf die Reaktion des Immunsystems hat. In dieser Studie wurden 252 Erwachsenen im Alter zwischen 50 und 80 Jahren entweder mit dem 7- valenten konjugierten oder dem 23-valenten reinen Polysaccharid- Impfstoff gegen Pneumokokken geimpft und zwei Jahre später die Anzahl an Pneumokokken- spezifischen Plasma- und Gedächtniszellen evaluiert, wobei keinerlei quantitative Unterschiede zwischen den zwei Gruppen festgestellt werden konnten.

2.3.3 T- Zell- Stimulation und Zytokinexpression

Man nimmt an, dass humorale Effektormechanismen des Immunsystems für den Schutz vor einer invasiven Pneumokokken- Infektion essentiell sind [34]. Während die Induktion der Antikörperproduktion sowie die Entwicklung von Gedächtniszellen („Memory cells“) nach Exposition mit Proteinantigenen klassischerweise von einer effizienten Interaktion zwischen T- und B- Zellen abhängt [4] [34] [38], ist die Immunantwort nach einer Stimulation mit Polysacchariden weitgehend unabhängig von der Präsenz der T- Zellen [4]. Konjugierte Pneumokokken- Impfstoffe erzielen eine bessere Stimulation des Immunsystems im Vergleich zu reinen Polysaccharid- Impfstoffen, was auf die Antigen- Verarbeitung sowie -präsentation (des konjugierten Proteins) mit Hilfe der MHC- Moleküle („Major histocompatibility complex“) und der daraus folgenden Rekrutierung von T- Zellen zurückzuführen ist [41]. Das Ausmaß der Antigen- spezifischen T- Zell- Aktivierung durch das Trägerprotein (des konjugierten Impfstoffes) bestimmt die Höhe der sezernierten Pneumokokken- spezifischen Polysaccharid- Antikörper [37]. Eine reduzierte Produktion an Antikörpern und der damit einhergehende verminderte Schutz gegen eine Pneumokokken- Infektion sind im Mausexperiment direkt assoziiert mit einer verminderten T- Zell- Antwort auf den Protein- Carrier [37]. Außerdem ist eine verringerte Produktion von Interleukin 5 (IL-5) nach in vitro Stimulation mit einem konjugierten Pneumokokken- Impfstoff mehrheitlich mit einer verringerten Sekretion von IgG- Antikörpern assoziiert [37].

An dieser Stelle wird kurz auf die zahlreichen Aspekte des spezifischen bzw. adaptiven Immunsystems, welche für die Entwicklung einer Immunität gegen mikrobielle Erreger von Bedeutung sind, eingegangen. Hinsichtlich der vielfältigen regulatorischen

Mechanismen der *unspezifischen* Immunität verweise ich auf weiterführende Literatur. Diese Ausführungen erheben zudem *keinen* Anspruch auf Vollständigkeit.

Das menschliche Immunsystem setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, einerseits aus einem natürlichen bzw. unspezifischen und andererseits aus einem spezifischen bzw. adaptiven Teil. Die *natürliche Immunantwort* umfasst sehr unterschiedliche, aber höchst effektive Mechanismen, u.a. natürliche Schutzbarrieren (z.B. intakte Haut), chemische Faktoren (z.B. Lysozym oder Magensäure), bestimmte Plasmaproteine (z.B. Komplementsystem oder Akut- Phase- Proteine), physikalische Faktoren (u.a. Flimmerepithelien oder Husten/ Niesen) und bestimmte (Effektor-) Zellen, die durch den Einfluss der spezifischen Immunität hochreguliert werden, so u.a. Monozyten, „Natural killer“- Zellen (NK- Zellen) und Granulozyten. Das *spezifische Immunsystem* hingegen basiert im Wesentlichen auf T- Lymphozyten und B- Lymphozyten, welche für zellmedierte bzw. humorale Abwehrmechanismen verantwortlich sind. Um eine effektive Immunantwort generieren zu können, ist allerdings ein koordiniertes Zusammenspiel zwischen unspezifischem und spezifischem Immunsystem unerlässlich [11].

Man unterscheidet vier Phasen der adaptiven bzw. spezifischen Immunantwort [11]:

- 1) Erkennungsphase (Erkennung des Antigens),
- 2) Aktivierungsphase (Aktivierung von immunkompetenten Zellen),
- 3) Effektorphase (Freisetzung von Zytokinen bzw. Antikörpern) und
- 4) Homöostase (Beenden der Immunantwort).

Eine zentrale Rolle kommt dabei den dendritischen Zellen zu, welche neben Makrophagen und B- Lymphozyten als professionelle Antigen- präsentierende Zellen (APZ) fungieren [11]. APZ werden durch Antigenaufnahme und -verarbeitung zur Auswanderung in die Lymphknoten, zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine/ Chemokine (z.B. IL-12) und zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM, VCAM oder CD80) angeregt [11]. Durch diese Mechanismen werden T- Zellen angelockt, welche die APZ mit Hilfe ihres T- Zell- Rezeptors (TCR) nach passenden Peptiden für ihren TCR absuchen. T- Lymphozyten erkennen über ihren T- Zell- Rezeptor nur prozessierte Peptidfragmente des ursprünglichen Antigens, d.h. acht bis 25 Aminosäuren lange Peptide, die anschließend mit Hilfe der MHC- Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert werden [11] - im Gegensatz zu den B- Zellen, welche in der Lage sind, über die auf ihrer Oberfläche exprimierten Immunglobuline (= B- Zell- Rezeptor, BCR) sequentielle oder strukturelle Anteile des gesamten Antigens an APZ zu erkennen. Für die Aktivierung von *T- Helferzellen* werden

die Peptidfragmente mithilfe MHC- Moleküle der Klasse II, für die Stimulation von *zytotoxischen T- Zellen* mithilfe MHC- Moleküle der Klasse I präsentiert [35]. Liegt ein passender Peptid- HLA- Komplex (HLA= „Humane Leukozytenantigene“)⁸ vor, erfolgt die Interaktion zwischen diesem und dem TCR sowie die Ankoppelung der Ko- Rezeptoren CD4 oder CD8, welche das erste Signal für die Aktivierung der T- Zellen und somit einen zentralen Schritt im adaptiven Immunsystem als Antwort auf invasive Mikroorganismen darstellt [11] [35]. Die Affinität des TCR für den HLA- Peptid- Komplex ist relativ gering, sodass die Bindung der Ko- Rezeptoren CD4 an HLA- Moleküle der Klasse II, von CD8 an HLA- Moleküle der Klasse I, von CD2 an LFA-3 oder von LFA-1 an ICAM-1, für die Ausbildung einer stabilen Interaktion zwischen T- Zellen und APZ umso nötiger ist, je weniger affin die TCR- Peptid- Interaktion ist. Der TCR ist mit weiteren Glykoproteinen, nämlich dem CD3- Komplex verbunden, welcher zur Signalübertragung in die Zelle dient und intrazelluläre Mechanismen aktiviert, wie z.B. den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration oder die Translokation von Proteinkinase C [11].

T- Helferzellen bzw. CD4⁺- Lymphozyten umfassen ca. 55 bis 70% der zirkulierenden Population an T- Zellen, erkennen sog. „exogene“ Peptide und üben eine unterstützende Funktion im Rahmen der spezifischen Immunantwort aus, indem sie durch die Sekretion von bestimmten Zytokinen eine entsprechende humorale Immunantwort bzw. Aktivierung der Makrophagen induzieren (siehe unten). CD8⁺- Lymphozyten bzw. zytotoxische T- Zellen hingegen erkennen v.a. endogene sowie virale Peptide und üben meist eine zytotoxische Wirkung aus, d.h. sie töten virusinfizierte, allogene oder Tumorzellen direkt ab, u.a. durch die Freisetzung von Perforin, Granzym, Granulysin oder TNF α (37). Allerdings ist diese Unterteilung der Aufgabenbereiche der CD4- bzw. CD8- positiven T- Lymphozyten nicht als vollkommen strikt anzusehen, da einerseits T- Helferzellen sowohl eine zytotoxische Wirkung entfalten als auch andererseits zytotoxische T- Zellen durch eine entsprechende Zytokinproduktion unterstützende Funktionen bzw. „Helfer“- Funktionen wahrnehmen können (37).

Als zweites, kostimulatorisches Signal dient die Interaktion zwischen CD80/CD86 (an der Oberfläche der APZ) mit dem CD28- Rezeptor (an der Oberfläche der T- Zellen), wodurch es zur Phosphorylierung weiterer intrazytoplasmatischer Enzyme kommt. Weitere wichtige Aktivierungssignale der T- Zellen werden durch Zytokine u.a. von Monozyten (z.B. IL-1) an die T- Zelle vermittelt [11]. Die Expression von ICOS („Inducible co-stimulator“),

⁸ Die HLA- Oberflächenmoleküle bzw. -proteine werden vom Genort MHC im Chromosom 6 kodiert [11]

vorzugsweise auf CD4- positiven Zellen, folgt der T- Zell- Aktivierung durch TCR und CD28 mit einem Höhepunkt von 48 Stunden nach der Exposition [31]. ICOS ist ein Mitglied der CD28- Familie, dem eine Schlüsselrolle in der T- Zell- vermittelten Effektor-Antwort zukommt. Eine ICOS- medierte Kostimulation- d.h. Bindung von ICOS an seinen spezifischen Liganden ICOS-L, welcher konstitutiv auf B- Zellen und APZ exprimiert wird- hat eine Superinduktion u.a. von IL-4, IL-10, IL-13 und IL-17 zur Folge und ist entscheidend für die Ausbildung einer Keimzentrumsreaktion und eines immunologischen Gedächtnisses [11] [31]. Ein Mangel an ICOS/ICOS-L bzw. an SAP („Signaling lymphocyte activation molecule associated protein“) ist mit einer defekten T- Zell- abhängigen humoralen Immunantwort und einem verringertem Schutz gegen eine Vielzahl mikrobieller Pathogene und somit mit der Entwicklung eines variablen Immundefektsyndroms („Common variable immunodeficiency“, CVID) assoziiert [11] [31]. SAP stellt ein zytoplasmatisches Adaptorprotein an CD4- positiven T- Zellen, CD8- positiven T- Zellen, NK- Zellen und einigen B- Zellen dar und ist für die zellulären Signalwege von Bedeutung. SAP scheint eine Schlüsselrolle in den frühesten Stadien der T- Zell- aktivierten humoralen Immunantwort zu spielen, und zwar *unabhängig* von ICOS. Im Mausexperiment führt ein Mangel an SAP zu einer stark reduzierten Induktion der Keimzentrumsreaktion sowie zu einer verringerten Stimulation der Memory B- Zellen [31].

Die Aktivierung der T- Zellen durch das erste und zweite kostimulatorische Signal führt (je nach Antigenkontakt) zu einer Sekretion diverser Zytokine, welche vielfältige, insbesondere regulatorische, proinflammatorische und chemotaktische Funktionen wahrnehmen. So z.B. sind einige davon, insbesondere IL-2, IL-4 oder TGF β („Transforming growth factor β “)- aber auch IFN γ , IL-5 und IL-13- für das Wachstum der B- Zellen und/ oder für die Differenzierung der B- Zellen in Antikörper- produzierende Plasmazellen fundamental. Außerdem fördern gewisse Zytokine den Klassenwechsel der Immunglobuline (so bewirken z.B. IL-2 und IFN γ den Wechsel von IgM auf IgG₁ oder IL-4 und IL-13 den von IgM zu IgE) und die Entwicklung der Memory- B- Zellen [11] [32]. Neben diesen Lymphozyten- regulierenden Eigenschaften aktivieren bestimmte Zytokine (u.a TNF β , IFN γ oder IL-5) Makrophagen, NK- Zellen, neutrophile Granulozyten und andere unspezifische Effektorzellen, welche (neben zytotoxischen T- Lymphozyten) im Rahmen der Effektorphase der Immunantwort hauptsächlich für die Elimination von mikrobiellen Erregern zuständig sind. Die sezernierten Zytokine steigern die Effektivität dieser Zellen und die Produktion von spezifischen Antikörpern erleichtert über eine

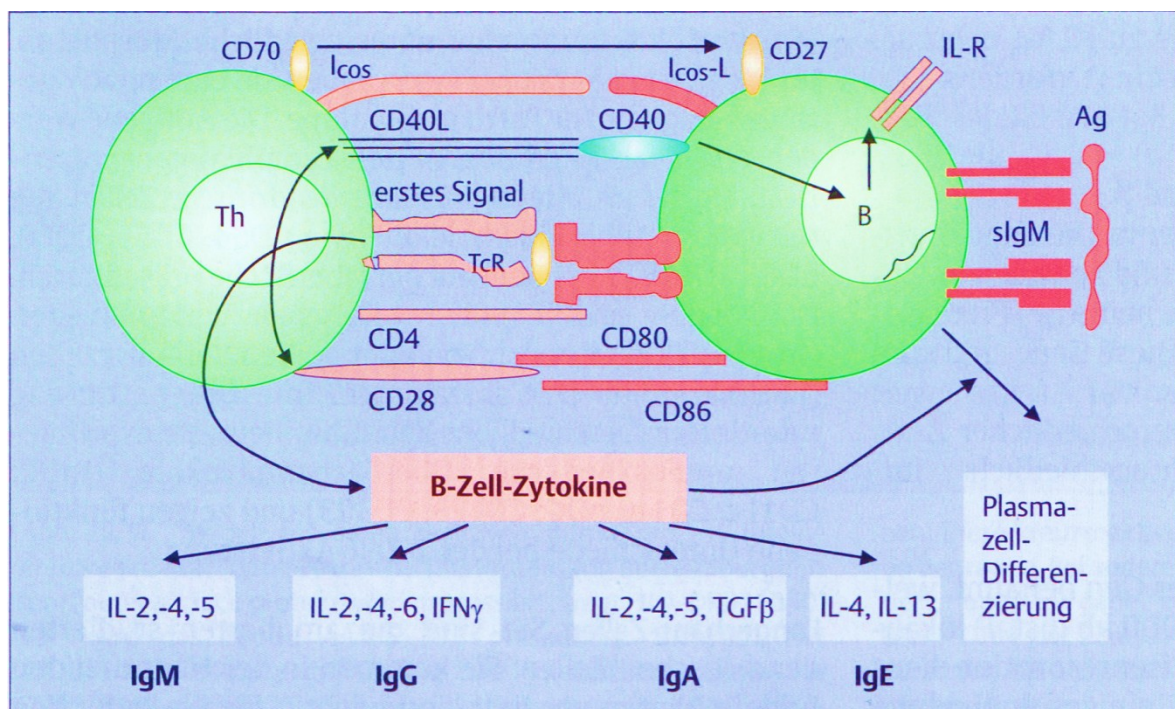
Oponisierung die Phagozytose der Erreger [11]. Die induzierte Effektorantwort kann je nach sezerniertem Zytokinmuster unterschiedlich ausfallen, da gewisse Zytokine die Aktivierung ganz bestimmter Effektorzellen bevorzugen. So führt z.B. eine überwiegende Produktion an IFN γ zu einer Stimulation der Makrophagen, während eine hohe Sekretion an IL-4 die Reifung der B- Zellen und die Bildung von IgG- Antikörpern fördert [11].

Wie bereits angedeutet, kommt es durch den Einfluss der T- Lymphozyten neben der Stimulation von unspezifischen Effektorzellen auch zu einer Differenzierung der B- Lymphozyten sowie in weiterer Folge zur Sekretion von Antigen- spezifischen Antikörpern. Das Wechselspiel zwischen T- Helferzellen und B- Lymphozyten basiert auf einer präzisen Rezeptor- Ligand- Interaktion, der sog. „*Cognate T- B- interaction*“ (Abbildung 2), welche in den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe stattfindet [11]. B- Zellen stellen hocheffiziente APZ dar, welche Antigene über ihre membranständige Antikörper (= BCR) spezifisch aufnehmen, prozessieren und effektiv präsentieren. Die T- Helferzelle erkennt über ihren TCR/CD3- Komplex einen Peptid- Antigen/ MHC II- Komplex auf der B- Zelle. Durch die Antigenaufnahme wird an der B- Zelle vermehrt CD80 und CD86 exprimiert, wodurch eine intensive Interaktion mit dem CD28- Rezeptor der T- Zellen ermöglicht wird. Diesem kostimulatorischen Zweitsignal folgt die Freisetzung von Zytokinen für die B- Zell- Reifung (siehe oben) sowie die Hochregulation von CD40- L und ICOS durch die T- Zellen. Die Bindung von CD40- L an CD40 und von ICOS- L an ICOS dient als Wachstums- und Differenzierungsimpuls für die anschließende Keimzentrumsreaktion. Ab diesem Zeitpunkt exprimiert die B- Zelle CD27- Moleküle, die an CD70 an der T- Zelle binden, wodurch der Klassenwechsel (von IgM zu IgG oder IgA) noch einen zusätzlichen Impuls erhält und die Selektion der B- Lymphozyten mit demjenigen BCR, welcher die höchste Affinität zum präsentierten Antigen aufweist, ermöglicht wird [11].

Eine effiziente Immunantwort gegen die meisten Antigene, insbesondere Proteine, erfordert für die terminale Differenzierung der B- Zellen und für die nachfolgende Antikörperproduktion die Hilfe der T- Lymphozyten. Für die Interaktion von B- Lymphozyten mit *Lipiden und Polysacchariden*, welche häufig aus repetitiven Determinanten bestehen, ist im Gegensatz zur Exposition mit Proteinen allerdings *keine* unterstützende Hilfe der T- Zellen erforderlich; daher bezeichnet man diese auch als *T- Zell- unabhängige Antigene* [11]. Außerdem hat sich gezeigt, dass die Immunantwort je nach Art des Antigens durch unterschiedliche zelluläre Signalwege reguliert wird. So läuft z.B. die *Protein- spezifische* Immunantwort nach Exposition mit intakten Pneumokokken

über den ICOS- Signalweg ab, während die *Polysaccharid-* induzierten Abwehrmechanismen *unabhängig* von ICOS, wohl aber abhängig von CD28 und SAP, stattfinden. Im Rahmen der Polysaccharid- spezifischen Immunantwort ist somit eine Interaktion von ICOS und ICOS-L, welche zur Ausbildung einer Keimzentrumsreaktion beiträgt und eine T- Zell- *abhängige* IgG- Produktion unterstützt, *nicht* erforderlich; zudem fallen T- Zell- Interaktion und Kostimulation nach Exposition mit Polysacchariden im Vergleich zu Proteinantigenen kürzer aus [31].

Abbildung 2: Schematische Darstellung der „Cognate T- B- interaction“ [11]



Malley et al. [32] betonen zwar die Notwendigkeit der Anwesenheit von T- Zellen zur Bildung antikapsulärer Antikörper und zur Induktion eines immunologischen Gedächtnisses, kommen aber zu dem Schluss, dass eine Bildung von Antikörpern nicht zwingend nötig und andere Effektormechanismen an der Regulation des Immunsystems beteiligt sein könnten. So zeigen Kinder nach der Exposition mit Pneumokokken eine signifikante Resistenz gegen eine schwere Erkrankung lange *vor* der Bildung von messbaren antikapsulären Antikörpern. Eine Immunität gegen eine Kolonisation mit Pneumokokken, unabhängig vom Serotyp des Erregers, kann in *Abwesenheit* von Antikörpern erreicht werden, wobei dies aber zwingend die Präsenz von CD4- positiven T- Zellen zum Zeitpunkt der Exposition erfordert [32]. So konnte im Mausexperiment festgestellt werden, dass weder bei einem völligen Fehlen von T- Lymphozyten noch bei einem isolierten Mangel an CD4- positiven T- Zellen immunologische

Schutzmechanismen gegen Pneumokokken aufgebaut werden konnten. Im Gegensatz dazu beeinträchtigte ein isolierter Mangel an CD8-positiven T-Zellen die Abwehrmechanismen gegen eine Infektion mit Pneumokokken nicht. Daher spielen laut Malley et al. [32] *zelluläre* Immunitätsfaktoren eine entscheidende Rolle bei der Prävention der Besiedelung mit Pneumokokken, welche als Ausgangslage für eine schwere Erkrankung anzusehen ist.

Die vielfältigen regulatorischen Mechanismen der *Homöostase* der T-Zell-vermittelten spezifischen Immunantwort werden u.a. durch das Molekül CTLA4 („Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen“, siehe dazu Kapitel 2.4.5 „Abatacept“ auf Seite 43f), durch die Bindung des Transmembranproteins Fas an den Fas-Liganden (diese induziert den programmierten Zelltod), bestimmte inhibitorisch wirksame Zytokine (z.B. IL-4, IL-10 oder TGF β), konstitutive CD4⁺/CD25⁺-Suppressor-T-Zellen oder durch das Fehlen bzw. Abklingen von aktivierenden bzw. (ko-)stimulierenden Signalen nach Antigenelimination (wodurch ein passiver Zelltod hervorgerufen wird), aber auch durch das Zytokin IL-2 vermittelt. Letzteres fördert nicht nur die Proliferation, sondern scheint auch für die Homöostase eine bedeutsame Rolle zu spielen. Prinzipiell ist die Homöostase von besonderer Relevanz, da fehlerhafte Mechanismen zur Beendigung der Immunantwort beispielsweise die Ausbildung von Autoimmunerkrankungen zur Folge haben [11].

2.3.3.1 Zellvermittelte Primär- und Sekundärantwort

Der Zweitkontakt mit einem spezifischen Antigen führt zu einer schnelleren und effizienteren Reaktion des Immunsystems. Die Ausbildung von Gedächtniszellen ermöglicht im Vergleich zu naiven Zellen eine raschere Immunantwort, da weniger (Re-)Aktivierungsschritte erforderlich sind [11] [12]. Ruhende T-Zellen erfordern mindestens zwei Signale, um aktiviert zu werden (siehe vorher); d.h. ohne das zweite Signal erfolgt auch keine Stimulation der ruhenden T-Lymphozyten. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als „Ignoranz“ bzw. „Non responsiveness“. Voraktivierte T-Lymphozyten können im Gegensatz dazu bereits durch ein inkomplettes Signal, d.h. durch den alleinigen MCH-Antigen-Kontakt, ihre spezifische Funktion wahrnehmen. Naive T-Zellen und rasch reagierende Memory-T-Zellen unterscheiden sich zusätzlich hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens, einer unterschiedlichen Expression von Chemokin-Rezeptoren/„Homing“-Rezeptoren (für eine organspezifische Antwort der Gedächtnis-T-Zellen, u.a. CD44 oder VLA4) sowie von Adhäsionsmolekülen, welche für die interzelluläre Kommunikation erforderlich sind, wie z.B. ICOS oder CD40-L [11]. Die

unterschiedlichen Faktoren, welche zur Ausbildung von Memory- T- Zellen führen, sind noch nicht vollständig geklärt; zudem ist auch die Rolle von IL-2 in diesem Kontext unklar, obwohl einige Hinweise dafür sprechen, dass IL-2 eine bedeutsame Rolle für die Ausbildung einer langanhaltenden Gedächtnisfunktion spielen könnte [13].

Impfstoffe, welche eine T- Zell- basierte Immunantwort generieren, scheinen initial die Bildung von Effektor- T- Zellen zu stimulieren und in weiterer Folge die Differenzierung von Memory- T- Zellen zu induzieren. Allerdings ist unklar, ob Memory- T- Zellen sofort nach der Antigenexposition, oder aber erst durch den Einfluss von T- Effektorzellen aktiviert werden [13]. Prinzipiell korreliert die Freisetzung von $IFN\gamma$ mit der primären T- Zell- vermittelten Effektorantwort, während die Sekretion von $IL-2$ wahrscheinlich für die Proliferation bzw. Differenzierung von Memory- T- Zellen erforderlich ist. Zudem ist eine leichte Tendenz von IL-2- produzierenden T- Zellen hin zur Differenzierung in Richtung Memory- T- Zellen erkennbar [13]. $IFN\gamma$ übt einen stimulierenden Effekt auf unspezifische Effektorzellen, u.a. Makrophagen, Naturkiller-Zellen oder neutrophile Granulozyten aus und fördert die Differenzierung von TH_1 - Zellen (siehe unten) [11]. Die gemeinsame Sekretion von $IFN\gamma$ und $IL-2$ hingegen stellt einen sehr bedeutsamen prädiktiven Faktor für die Entwicklung einer langanhaltenden Gedächtnisfunktion dar, sodass ein synergistischer Effekt hinsichtlich der Ko- Produktion beider Zytokine angenommen werden kann [13].

Protein- basierte Impfstoffe, so z.B. Tetanustoxoid, Diphtherietoxoid oder Hepatitis- B- Antigene, induzieren eine vermehrte Produktion von IL-2, nicht aber von $IFN\gamma$ - also eine vermehrte Stimulation von $IL-2^+IFN\gamma^- CD4^+$ T-Zellen. Im Gegensatz dazu führt eine akute bakterielle oder virale Infektion, z.B. mit in vitro präparierten RSV-Antigenen („Respiratory syncytial Viren“) oder inaktivierten Influenzaviren, in erster Linie zu einer vermehrten Sekretion von $IFN\gamma$ im Vergleich zu IL-2, also zu einer vorwiegenden Induktion von $IL-2^-IFN\gamma^+$ und $IL-2^+IFN\gamma^+$ Zellen, wobei nur wenige davon ausschließlich IL-2 freisetzen. Man kann davon ausgehen, dass die induzierten Immunmechanismen gegen RSV und Influenzaviren primär durch eine akute Infektion im Kindesalter, mehrheitlich innerhalb des ersten bzw. bis zum dritten Lebensjahr, hervorgerufen werden. Außerdem ist bisher kein Impfstoff gegen RSV verfügbar und die Immunantwort gegen Influenzaviren kann durch wiederholte Infektionen, aber auch durch Schutzimpfungen, welche aber in der Regel erst im Erwachsenenalter erfolgen, getriggert werden [12].

Die durch Exposition mit Proteinantigenen induzierten $IL-2^+IFN\gamma^- CD4^+$ T-Zellen weisen die Fähigkeit auf, sich je nach Bedarf entweder zu TH_1 - oder TH_2 - Zellen differenzieren zu können, während eine akute Infektion eine starke TH_1 - vermittelte Immunantwort zur

Folge hat [12]. TH₁- Zellen und TH₂- Zellen stellen zwei unterschiedliche Phänotypen der CD4- positiven Effektorzellen dar, die unterschiedliche Zytokine sezernieren und unterschiedliche Angriffspunkte gegen mikrobielle Erreger aufweisen. Zusätzlich zu den TH₁- und TH₂- Zellen wurden in den letzten Jahren neue Untergruppen an CD4- positiven T- Lymphozyten identifiziert, u.a. TH₁₇- Zellen [33] [35] (siehe unten). Aktivierte TH₁- Zellen stimulieren über IFN γ und IL-2 v.a. Makrophagen bzw. Monozyten sowie die Freisetzung von IgG₁ und IgG₃; während eine TH₂- basierte Immunantwort über IL-4 bzw. IL-5 insbesondere eosinophile Granulozyten sowie die Produktion von IgE und IgG₄ anregt [11] [12]. Zusätzlich könnten IL-2⁺IFN γ Zellen zur Produktion von Antikörpern beitragen. Davon lässt sich ableiten, dass die Art der Differenzierung der CD4- Zellen von dem Kontext der Antigenexposition, nicht aber von der Affinität der Epitope oder des TCR abhängig sein könnte [12].

Ähnliche Ergebnisse zeigt auch der Vergleich zwischen einer chronischen Infektion mit dem Hepatitis- C- Virus (HCV) und einer spontanen Remission einer HCV- Infektion [14]. Während einer chronischen Infektion mit HCV kommt es zu einer signifikanten Abnahme der T- Zell- vermittelten Immunantwort, insbesondere von IL-2- produzierenden Zellen, bei Erhalt der IFN γ - sezernierenden T- Zellen. Nach einer spontanen Remission einer HCV- Infektion ist dies allerdings genau umgekehrt; hier überwiegt die Produktion von Interleukin 2 deutlich derjenigen von IFN γ . Die mangelnde Sekretion von IL-2 im chronischen Stadium der HCV- Erkrankung ist auf eine Überstimulation der T- Zellen zurückzuführen, d.h. in diesem Kontext übt die T- Zellpopulation eine Effektorfunktion aus und verliert dabei gleichzeitig die Fähigkeit zur Sekretion von IL-2. Ein Mangel an Interleukin 2 führt zu einer beeinträchtigten Sekretion von IFN γ (denn IL-2 stimuliert nämlich u.a. die Sekretion von IFN γ) und zu einer verminderten Proliferation der T- Lymphozyten. Eine Reduktion der Viruslast anhand einer kombinierten antiviralen Therapie (im Falle einer chronischer HCV- Infektion mit IFN α und Ribavirin) kann folglich die Fähigkeit der T- Zellen zur Sekretion von IL-2 wiederherstellen und somit auch zu einem Zuwachs ihrer Proliferationsraten führen [14].

Das Zusammenspiel zwischen zellmediierter Primär- und Sekundärantwort wird auch anhand des Vergleichs zwischen Personen, die in Malaria- Endemiegebieten leben und jenen, die nie gegenüber Malariaerregern exponiert waren, deutlich [13]. Personen in Malaria- Endemiegebieten zeigen nach ex vivo Stimulation mit Malaria- Antigenen nur eine geringe Produktion von IFN γ , hingegen aber eine signifikant höhere Sekretion an Interleukin 2, wahrscheinlich als Ausdruck einer Memory- Antwort. Im Gegensatz dazu

weisen unexponierte Personen nach ex vivo Stimulation mit Malaria- Antigenen eine sehr geringe Produktion sowohl von IFN γ als auch von IL-2 auf [13]. Nach einer Malaria-Impfung wird bei Letzteren eine gesteigerte Produktion beider Zytokine ersichtlich, wobei aber IL-2 nach drei Monaten wieder auf das Ausgangsniveau abfällt. Bei Malaria-Exponierten führt die Malaria- Impfung hingegen zu einem signifikanten Zuwachs an IFN γ und Memory- Zellen, während IL-2 nur wenig ansteigt. Die Messung von IFN γ und IL-2 eine Woche nach der Impfung gegen Malaria dient bei nicht exponierten Personen als prädiktiver Parameter für die Ausbildung einer langanhaltenden Gedächtnisfunktion nach drei Monaten, während bei Malaria- exponierten Personen die alleinige Sekretion von IFN γ eine Woche nach der Impfung mit der Ausbildung einer bleibenden Gedächtnisfunktion nach drei Monaten korreliert [13].

Die alleinige Sekretion von IFN γ nach einer Malaria- Impfung geht somit bei nicht exponierten Personen kaum mit der Ausbildung von Gedächtniszellen einher, zudem korreliert auch die alleinige Produktion von IL-2 nur marginal mit einer langanhaltenden Immunität. Wahrscheinlich bestimmt die Koproduktion beider Zytokine eine langanhaltende Memory- Funktion [13].

2.3.3.2 Akute Pneumokokken- Infektion

Eine akute Infektion mit Pneumokokken führt bei Erwachsenen zu einer transienten systemischen Depletion der T- Zellen. Im Laufe der Genesung wird jedoch ein verstärkter Anstieg von zellulären und humoralen Abwehrmechanismen beobachtet, die mit einer erhöhten Sekretion von IL-10 und IFN γ einhergehen [34]. Die anfängliche systemische T- Zell- Depletion könnte sowohl als Ursache, oder aber auch als Folge der akuten Infektion anzusehen sein. Eine T- Zell- Migration in die bzw. eine T- Zell- Sequestration in den infizierten Geweben und peripheren lymphatischen Organen könnten dabei zur peripheren Lymphopenie beitragen [34]. Der Zusammenhang zwischen Normalisierung der Anzahl der T- Zellen im Verlauf der Erkrankung und klinischer Verbesserung des Gesundheitszustandes legt die zentrale Rolle der CD4- positiven T- Zellen im gesamten Abwehrgeschehen nahe. Die Zytokine IL-10 und IFN γ , welche während der Phase der Rekonvaleszenz vermehrt ausgeschüttet werden, könnten eine modulatorische Wirkung auf die Produktion von Antikörpern ausüben [34]. Unterschiedliche Zytokinprofile können unterschiedliche Auswirkungen auf die Antikörperproduktion und Entwicklung einer B- Zell- Memory ausüben, wobei aber der genaue Mechanismus hierfür nicht geklärt ist [42]. So können sowohl Zytokinsekretion als auch Quantität und Qualität der nachfolgenden

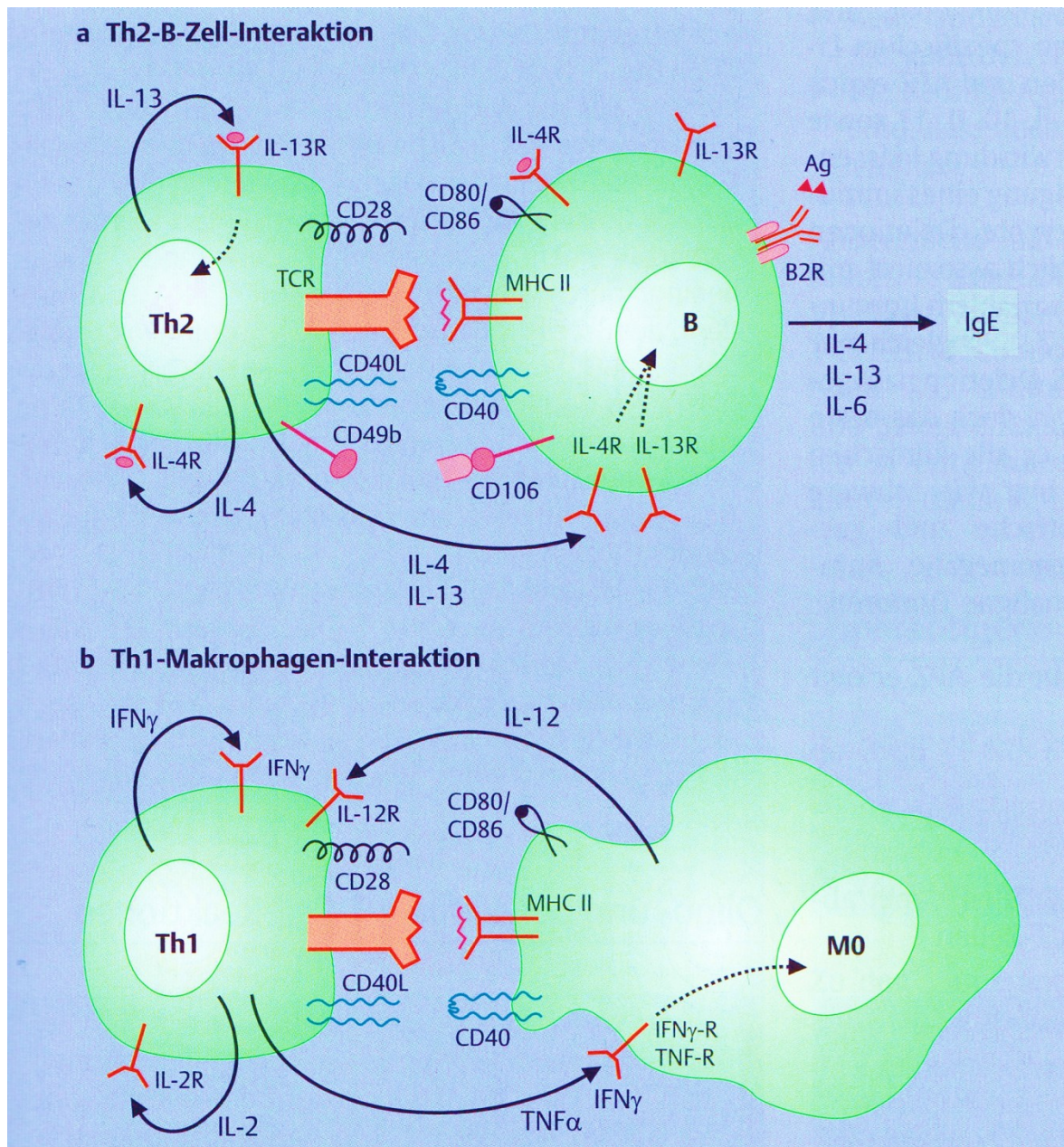
Antikörperproduktion je nach Art der Antigen- Exposition (Polysaccharide oder Protein-Antigene) unterschiedlich ausfallen [34].

CD4- positive T- Zellen mit einem *TH₁-basierten Zytokinprofil* (z.B. IL-2, IL-12, IFN γ , TNF α , TNF β) spielen für die Stimulation einer humoralen Antwort gegen *Streptococcus pneumoniae* eine sehr wichtige Rolle [34]. Eine vermehrte Ausschüttung von TH₁- assoziierten Zytokinen führt über IFN γ und TNF α zu einer starken Aktivierung der Makrophagen (Abbildung 3), zu einer Stimulation der Monozyten und zur Bildung von IgG₁ und IgG₃ [11].

Das Zytokin IL-2 fördert die Proliferation der T- Zellen (sog. autokrine und parakrine Wirkung) [35], aber auch Wachstum und Differenzierung der B- Zellen und die Aktivierung von NK- Zellen. Außerdem fördert IL-2 die Produktion weiterer Zytokine, so u.a. von IFN γ , IL-1, IL-6, TNF β oder TGF β [11]. IFN γ , ein weiteres TH₁- assoziiertes Zytokin, ist für die Entwicklung einer Immunität gegen Pneumokokken erforderlich [35]. So fördert in einem Mausexperiment die therapeutische Gabe von IFN γ die Überlebensrate während einer akuten Infektion mit Pneumokokken; eine Blockade von IFN γ hingegen zog den Tod der untersuchten Tiere mit sich [35]. Die wichtigste Aufgabe von IFN γ in der Abwehr mikrobieller Erreger stellt (neben Stimulierung von NK- Zellen und neutrophilen Granulozyten) die Aktivierung von Makrophagen dar [38]; außerdem beeinflusst IFN γ das Wachstum und die Differenzierung von Immunglobulin- produzierenden B- Zellen [38] und könnte somit auch eine regulierende Funktion auf die Antikörperproduktion gegen Pneumokokken ausüben [38]. Ferner wird durch den Einfluss von IFN γ die Expression von MHC I und MHC II induziert, wodurch die Immunantwort sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene verstärkt wird [11].

Laut Singh et al. [35] tragen *TH₂- assoziierte Zytokine* (z.B. IL-4, IL-5, IL-13) *nicht* zu einer optimalen Immunantwort gegen Pneumokokken bei. Die Sekretion von TH₂-basierten Zytokinen induziert über die Freisetzung von IL-4 die Bildung von IgE- oder IgG₄- Antikörpern (Abbildung 3) bzw. führt über die Sekretion von IL-5 zu einer Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und ist somit typisch für IgE- vermittelte Allergien [11]. So zeigt sich beispielsweise im Mausexperiment, dass eine vermehrte Ausschüttung von TH₂-basierten Zytokinen im Rahmen einer Pneumokokken- Infektion einen explosionsartigen Erregerzuwachs und eine erhöhte Rate an Sinusitiden im Vergleich zur Sekretion eines TH₁- dominanten Zytokinprofils zur Folge hat [35].

Abbildung 3: a) Aktivierung der Synthese von IgE durch IL-4 und IL-13 und
 b) Aktivierung von Makrophagen durch IFN γ [11]



Die Rolle des Zytokins IL-10 im Rahmen einer Pneumokokken- Infektion ist unklar. Dieses Zytokin kann weder den TH₁- noch den TH₂- Zellen eindeutig zugeordnet werden [11]. Einerseits dämpft IL-10 die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (u.a. von TNF α oder IL-1) [35] [38], andererseits übt es auch direkte Effekte auf die B- Zellen aus, wie z.B. Prävention der Apoptose oder Förderung von Proliferation und Differenzierung der Plasmazellen. Zudem trägt IL-10 in Kooperation mit anderen Zytokinen zum Klassenwechsel der Immunglobuline bei [38], sodass moderate Spiegel dieses Zytokins wahrscheinlich für die Ausbildung einer optimalen adaptiven Immunantwort von Bedeutung sind [35].

Die Beteiligung der *TH₁₇- Zellen* an der Entwicklung einer Immunität gegen Pneumokokken wurde bisher nur gering erforscht. Diese proinflammatorisch wirksamen T-Lymphozyten wurden erst vor weniger Zeit entdeckt und scheinen an chronisch-entzündlichen Immunprozessen bzw. Autoimmunerkrankungen beteiligt zu sein [35]. Schmid et al. [33] zeigen auf, dass die Exposition mit den Pneumokokken- Antigenen PcSB, StkP und PsaA eine *TH₁₇- dominierte* Immunantwort bei Personen aller Altersgruppen zur Folge hat. Der entscheidende Unterschied zwischen den verschiedenen Altersgruppen liegt lediglich in der Produktion eines weit schmäleren Spektrums an unterschiedlichen Zytokinen bei Studienteilnehmern höheren Alters. Die Analysierung der Rolle der *TH₁₇- Zellen*, des genauen Zusammenspiels zwischen IFN γ und IL-10 sowie der spezifischen Funktionen der unterschiedlichen Zytokine, wie z.B. IL-12, IL-4 oder IL-5, im Rahmen einer Pneumokokken- Infektion bedarf weiterer Studien [35].

Außerdem ist die präzise Rolle der Interaktion zwischen Peptiden und MHC II-Molekülen, welche die Entwicklung einer protektiven Immunität gegen Pneumokokken bestimmt, unklar [35]. Der genetische Polymorphismus von HLA- Molekülen, welche Antigen- Peptide an T- Helferzellen präsentieren, übt unterschiedliche Auswirkungen auf die nachfolgende Immunantwort aus, da manche HLA- Moleküle nicht in der Lage sind, einzelne Peptide eines vorgegebenen Proteins zu binden [35]. Die HLA- Assoziation bei gewissen Autoimmun- oder Infektionserkrankungen resultiert aus der unterschiedlichen Fähigkeit der HLA- Moleküle, bestimmte Peptide binden zu können [11].

2.3.4 Immunantwort bei Neugeborenen und Kindern

Kinder sind besonders anfällig für Erkrankungen, die durch eingekapselte Bakterien, wie z.B. *Streptococcus pneumoniae*, hervorgerufen werden [45]. Pro Jahr versterben ca. eine Million Kinder unter fünf Jahren an schweren Pneumokokken- Infektionen [32] [42].

Polysaccharid-basierte Pneumokokken- Impfstoffe stellen T- Zell- unabhängige Typ II-Antigene⁹ [45] dar und zeigen nur ein geringes immunogenes Potential bei Kindern [1] [43]. Generell lässt sich bei Kindern in den ersten Lebensjahren nur eine geringfügige Stimulation des Immunsystems nach Exposition mit T- Zell- unabhängigen Impfstoffen beobachten [45]. Im Gegensatz zu Polysaccharid- basierten Impfstoffen sind konjugierte

⁹ Antigene, die eine T- Zell- unabhängige Immunantwort zur Folge haben, werden in zwei Gruppen untergliedert: Typ I Antigene (z.B. Lipopolysaccharide) und Typ II- Antigene (z.B. Pneumokokken- Polysaccharide) [45].

Impfstoffe gegen Pneumokokken in der Lage, auch bei Kindern den Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses zu fördern [42] [43].

Eine viermalige Impfung mit einem 7- valenten (bzw. 13- valenten) konjugierten Pneumokokken- Impfstoff, wobei standardmäßig drei Dosen davon innerhalb der ersten sechs Lebensmonate und eine weitere Dosis im Alter von 12 bis 15 Monaten verabreicht werden [30], verhindert das Auftreten von schweren Erkrankungen und Todesfällen, sowohl in industrialisierten als auch in Entwicklungsländern [42]. Der größte Rückgang der Erkrankungsraten durch den Einsatz des 7- valenten konjugierten Impfstoffes im Zeitraum von 1998 bis 2001 wurde bei Kindern unter zwei Jahren festgestellt (78%), gefolgt von Kindern im Alter von zwei Jahren, bei denen ein Rückgang von 43,8% beobachtet wurde. Bei älteren Kindern konnte allerdings keine Veränderung festgestellt werden [29]. Whitney et al. [29] machen darauf aufmerksam, dass selbst bei einer geringeren als der empfohlenen viermaligen Verabreichung des konjugierten Pneumokokken- Impfstoffes ein Rückgang der Erkrankungshäufigkeit bei Kindern beobachtet werden konnte. Aber auch Erwachsene, für welche der konjugierte Impfstoff nicht empfohlen ist, profitieren indirekt von der Impfung von Kindern [29] [30]. Die Inzidenz an Pneumokokken- Infektionen von Personen im Alter zwischen 20 und 39 Jahren fiel um 32%, bei Personen im Alter zwischen 40 und 64 Jahren um 8% und bei den Personen über 65 Jahren um 18% [29]. Zudem können konjugierte Pneumokokken- Impfstoffe, unabhängig von Typ und Anzahl der Carrierproteine, zeitgleich mit anderen Impfstoffen (die im Laufe des ersten Lebensjahres empfohlen sind) verabreicht werden, ohne die jeweilige Immunantwort gegenseitig zu reduzieren bzw. ohne vermehrt Nebenwirkungen hervorzurufen [30].

Trotz der großen Erfolge der Impfkampagnen stellen Pneumokokken aber nach wie vor eine häufige Ursache für schwere Erkrankungen und Todesfälle bei Kindern in den ersten drei Lebensmonaten dar [42]. Um dieser Tatsache gerecht werden zu können, wurde der 7- valente konjugierte Impfstoff durch den Zusatz von sechs weiteren kapsulären Pneumokokken- Polysacchariden zu einem 13- valenten Impfstoff weiterentwickelt [30]. Ein Vergleich zwischen 7- valentem und 13- valentem konjugierten Impfstoff bei 606 Kindern zeigt ähnliche Ergebnisse hinsichtlich Effektivität und Verträglichkeit [30]. Beide Impfstoffe wurden jeweils im Alter von drei, fünf und elf Monaten an je 303 Kinder simultan zum sechsfachen Impfstoff gegen Diphtherie- Tetanus- Pertussis- Hepatitis B- Poliomyelitis und Haemophilus influenzae Typ B verabreicht und die entsprechenden Immunantworten, d.h. Pneumokokken- spezifische IgG, sowohl jeweils ein Monat nach

Applikation der zwei Primärdosen sowie ein Monat nach Gabe der dritten Dosis gemessen [30]. Obwohl die induzierten IgG- Antikörper gegen die Serotypen 6B und 23F nach den ersten zwei Verabreichungen des 13- valenten konjugierten Impfstoffes im Vergleich zum 7-valenten Impfstoff geringer ausfielen, konnte nach der dritten Verabreichung kein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Impfstoffen hinsichtlich IgG- Produktion gegen alle sieben Polysaccharide (der Serotypen 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) festgestellt werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Addition von Polysacchariden sechs neuer Serotypen, d.h. der Serotypen 1, 3, 5, 6A, 7F und 19A, keine Veränderung der globalen Immunantwort gegen Pneumokokken- Antigene hervorruft. Zudem zeigten 96,6% bis 100% der Kinder eine entsprechende Immunantwort nach der Exposition mit den sechs zusätzlichen Serotypen des 13- valenten Impfstoffes, wobei jene gegen Serotyp 3 mit 93,9% einen Hauch geringer ausfiel. Außerdem beeinträchtigen weder der 7- valente noch der 13- valente konjugierte Impfstoff die Immunantwort des parallel dazu verabreichten sechsfachen Impfstoffes [30]. Obwohl in dieser Studie ein vereinfachtes Impf- Schema verwendet wurde, d.h. eine dreimalige Impfung anstatt der standardmäßigen vierfachen Impfung, gibt es einige Anzeichen dafür, dass der 13- valente konjugierte Impfstoff zu einem erweiterten Impfschutz gegen schwere Pneumokokken- Infektionen beitragen kann. Zudem kann man davon ausgehen, dass die Applikation des 13- valenten konjugierten Impfstoffes gemäß Standardschema ein vergleichbares Resultat analog zu dieser Studie erzielen würde [30].

Obwohl konjugierte Pneumokokken- Impfstoffe einen hohen Stellenwert bei der Impfung von Kindern unter zwei Jahren haben, weisen sie auch einige Nachteile auf, nämlich einen auf wenige Serotypen limitierten Impfschutz [38], hohe Kosten und multiple Injektionen [32]. Aus diesen Gründen ist man bestrebt, Protein- basierte Impfstoffe zu entwickeln, die sowohl weniger Aufwand als auch weniger Kosten mit sich ziehen sollen [38].

Der Nasopharynx, insbesondere die nasopharyngealen Tonsillen (Adenoide), könnten bei Kindern eine wichtige Rolle für die lokale Immunabwehr gegen Pneumokokken spielen, indem sie zur Induktion einer Memory- IgG- Antwort beitragen [38] [39]. Daher könnte eine Immunisierung der Schleimhäute zu einem wirkungsvollen Schutz gegen eine Pneumokokken- Infektion beitragen. Die Pneumokokken- assoziierten Proteine CbpA, PsaA und PspA scheinen in diesem Zusammenhang gute Antigene der Schleimhäute des oberen Respirationstraktes bei Kindern darzustellen [39].

Ähnlich wie bei Erwachsenen zeigen Antikörperbildung und Zytokin- Sekretion bei Kindern je nach Stadium der Erkrankung einen phasenhaften Verlauf. So ist bei Kindern

beispielsweise die Konzentration an Antikörpern gegen die Pneumokokken- Proteine Pneumolysin, PspA und CbpA während einer akuten Erkrankung gering, während jene der CD4- positiven T- Zellen, welche die Zytokine IL-10 und TNF α sezernieren, in der Akutphase deutlich höher ausfällt als während der Genesungsphase und im Vergleich zu gesunden Kindern [40].

Bei Neugeborenen ist die T- Zell- abhängige Immunantwort noch völlig unausgereift, was durch eine fehlende T- Helfer- Zell- Antwort (TH₁) und eine geringe Fähigkeit zur Induktion einer T- Zell- Memory charakterisiert ist. Daher kann eine Impfung von Neugeborenen mit dem konjugierten Impfstoff unfähig sein, einen langlebigen Schutz vor einer Pneumokokken- Infektion zu gewährleisten. Außerdem könnten diese auch eine Hyporeaktivität auf nachfolgende Infektionen mit sich ziehen [42]. Van den Biggelaar et al. [42] haben den Effekt der dreimaligen Gabe des konjugierten 7-valenten Impfstoffes zu Geburt, im Alter von einem und zwei Monaten einerseits sowie im Alter von einem, zwei und drei Monaten andererseits auf die nachfolgende T- Zell- Antwort an 198 Kindern in Papua Neu Guinea, einem Hochrisikogebiet für schwere Erkrankungen und Todesfälle, welche durch Pneumokokken bedingt sind, untersucht. Diejenigen Kinder, die zum Zeitpunkt der Geburt geimpft worden waren, wiesen eine höhere Produktion an TH₂- assoziierten Zytokinen als Antwort auf das Trägerprotein CRM₁₉₇ des Impfstoffes im Vergleich zu denjenigen Kindern auf, die ihre erste Impfung im Alter von einem Monat erhalten hatten; Letztere zeigten nämlich einen Mix aus TH₁- und TH₂- assoziierten Zytokinen. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass eine neonatale Immunisierung mit dem konjugierten Impfstoff eine TH₂- dominante Immunantwort stimuliert, während eine TH₁- basierte Immunreaktion erst nach einer Impfung im Alter von einem bzw. zwei Monaten generiert werden kann [42]. Eine Gabe des 7-valenten konjugierten Impfstoffes zum Zeitpunkt der Geburt ist somit nicht in der Lage, neonatale T- Lymphozyten zu einer signifikanten Produktion an TH₁- assoziierten Zytokinen anzuregen [42].

Ähnliche Ergebnisse liefern Jakobsen et al. [37] in einem Mausexperiment: Die Produktion von IgG- Antikörpern nach Stimulation mit einem konjugierten Impfstoff fiel bei neugeborenen Tieren im Vergleich zu den erwachsenen Tieren deutlich geringer aus. Im Gegensatz zu neugeborenen und jungen Mäusen zeigten sich bei adulten Mäusen nach in vitro Stimulation mit dem Trägerprotein (Tetanusprotein) des konjugierten Impfstoffes eine erhöhte Proliferationsrate sowie eine höhere Sekretion von IFN γ . Bei neugeborenen Tieren wurde ein geringes, vorwiegend TH₂- basiertes Zytokinprofil festgestellt, während

adulte Mäuse sowohl TH₁- als auch TH₂- assoziierte Zytokine aufwiesen. Die Sekretion an TH₂- Zytokinen erwies sich stark altersabhängig und eine eingeschränkte Produktion von IFN γ resultierte in einem reduzierten Verhältnis von IFN γ zu IL-5. Die fehlende Produktion von Antikörpern bei neugeborenen Tieren konnte eindeutig auf den Mangel an IL-5 zurückgeführt werden [37].

2.4 Pneumokokken- Impfung und Immunsuppression

2.4.1 Vorwort

Die zugrundeliegende Autoimmunerkrankung, Art und Intensität der immunsuppressiven Therapie sowie das Alter des Patienten beeinflussen die jeweilige Impfstoff- spezifische Immunantwort [46]. Viele Studien haben die Wechselwirkungen zwischen immunsupprimierenden Medikamenten und verschiedenen Impfstoffen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis untersucht.

Generell scheint es so, dass jene Patienten mit rheumatoider Arthritis, welche mit DMARDs behandelt werden, eine ausreichende, wenn auch geringere Immunantwort als die Normalbevölkerung, entwickeln können, wobei dies davon abhängt, welche Immunsuppressiva- Klassen mit welchen Impfstoffen kombiniert werden [4] [47]. So z.B. scheint der 23- valente Polysaccharid- basierte Impfstoff gegen Pneumokokken eine eingeschränkte Immunantwort bei manchen Patienten mit rheumatischen Grunderkrankungen hervorzurufen, sodass konjugierte Pneumokokken- Impfstoffe theoretisch zu einem besseren Schutz bei Kindern und Erwachsenen mit diesen Erkrankungen führen könnten [47]. Außerdem schwinden protektive Antikörperspiegel bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen unter einer Therapie mit DMARDs schneller als jene der Normalbevölkerung, sodass Auffrischungsimpfungen bei diesen Personen frühzeitig stattfinden sollten [47].

Bisherige Studien, welche die immunologischen Auswirkungen von Pneumokokken- Impfungen bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen untersuchen, verwenden fast ausschließlich 23- valente Polysaccharid- basierte Impfstoffe (so wie z.B. Pneumovax®), welche eine T- Zell- unabhängige Immunantwort zur Folge haben [47], während die Gabe eines 7- bzw. 13- valenten konjugierten Pneumokokken- Impfstoffes, beispielsweise Prevenar®, oder anderer T- Zell- abhängiger konjugierter Pneumokokken- Impfstoffe, bisher kaum in Betracht gezogen wurde [47]. Aus diesem Grund wird auch die Wirksamkeit einer Pneumokokken- Impfung, v.a. in den klinischen Studien, in der Regel

durch die Messung der Antigen- bzw. Serotyp- spezifischen Antikörpertiter evaluiert, während nur sehr wenige Studien die zellmedierten Immunmechanismen analysieren, welche im Gegensatz zur Applikation von reinen Pneumokokken- Polysacchariden durch die Exposition mit einem konjugierten Pneumokokken- Impfstoff induziert werden. Folglich werden die spezifischen zellvermittelten Reaktionen in den allermeisten Studien nicht explizit erfasst; trotzdem sollen die Auswirkungen der verschiedenen Immunsuppressiva- Klassen auf die Effektivität von Pneumokokken- Impfungen im Anschluss dargestellt werden. Allerdings beschränkt sich diese Arbeit auf die immunmodulatorischen Substanzen Methotrexat, ausgewählte TNF α - Inhibitoren (Adalimumab, Infliximab und Etanercept), Kortikosteroide, Abatacept und Rituximab.

2.4.2 Monotherapie mit Methotrexat

Der Folsäure- Antagonist Methotrexat (MTX) stellt einen wichtigen Pfeiler in der medikamentösen Therapie der rheumatoiden Arthritis, aber auch von anderen (rheumatischen) Erkrankungen, dar [47]. Allerdings gibt es nur wenige objektive Daten über die Auswirkungen von MTX auf die Wirksamkeit des 23- valenten Pneumokokken- Polysaccharid-Impfstoffes [48]. Einige Studien deuten darauf hin, dass MTX die Wirksamkeit einer Pneumokokken- Impfung bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen zu beeinträchtigen scheint [19] [47] [48]. Eine Therapie mit MTX und höheres Alter gelten als unabhängige Faktoren für eine abgeschwächte Immunantwort [1] [19], wobei die Kombination von bestimmten TNF α - Antagonisten mit MTX sogar eine noch geringere Immunantwort zur Folge haben könnte [47]. Kapetanovic et al. [19] stellen fest, dass eine Therapie mit MTX, unabhängig von der Verabreichung von TNF α - Inhibitoren, zu einer geringen Immunantwort nach Impfung mit dem 23- valenten Polysaccharid- Impfstoff führt [19].

Außerdem scheint ein individuell gutes klinisches Ansprechen auf die Behandlung mit MTX bei Patienten mit RA, das sich im Bedarf einer niedrigen therapeutischen Dosis an MTX äußert, eine reduzierte Immunantwort nach einer Impfung mit sich zu ziehen [19]. Patienten, die mit höheren Dosen an MTX (d.h. 15 mg MTX pro Woche oder mehr) behandelt werden, weisen nämlich eine bessere Immunantwort nach Pneumokokken- Impfungen auf als jene mit einer niedrigeren Dosierung [19]. Daneben scheint auch die Dauer der Erkrankung einen wesentlichen Einfluss auf die Immunantwort zu haben: Während Patienten mit längerer Krankengeschichte eine reduzierte Antikörperproduktion aufweisen, konnte bei Patienten, denen erst vor kurzer Zeit die Diagnose RA gestellt

worden war, keine eingeschränkte Immunantwort festgestellt werden [47] [49]. Somit ist auch denkbar, dass die Erkrankung an sich und nicht nur ihre medikamentöse Behandlung einen wichtigen Einfluss auf die Immunantwort ausüben könnte [19] [50].

Ganz im Gegensatz zur Pneumokokken-Impfung ist eine Monotherapie mit MTX bei **Influenza-** Impfungen **nicht** mit einer reduzierten Immunantwort assoziiert [47]: Siehe dazu auch Kapitel 2.5.1 „Influenza“ auf S.47f. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der Art des Antigens begründet sein. Die Gabe von Polysaccharid- Antigenen, wie z.B. der rein Polysaccharid- basierte Pneumokokken- Impfstoff, kann bei Patienten unter einer Therapie mit MTX zu einer geringeren Stimulation des Immunsystems führen als die Exposition mit Polypeptid- Antigenen [19]. Dies legt die hypothetische Annahme nahe, dass eine Verabreichung von T- Zell- abhängigen Impfstoffen (z.B. gegen Influenza) bei Personen unter einer Therapie mit MTX zu einer besseren Immunantwort führen könnte. Es ist aber nach wie vor unklar, ob MTX die T- Zell- unabhängige Antikörperproduktion stört oder nicht. Es sind weitere Studien erforderlich, welche bei Patienten unter einer laufenden Therapie mit MTX die klinische Wirksamkeit von Polysaccharid- und Protein- Impfstoffen miteinander vergleichen [47].

Um die Induktion von protektiven Antikörpertitern zu fördern, könnte bzw. sollte eine Impfung gegen Pneumokokken bereits vor Beginn einer Therapie mit MTX erfolgen [19] [47]. Außerdem könnte eine zwischenzeitliche Unterbrechung der MTX- Therapie zum Zweck einer Impfung sich positiv auf die Immunantwort auswirken [47], während eine Reduktion der Dosis von MTX in dieser Hinsicht wenig erfolgversprechend zu sein scheint [19]. Coulson et al. [48] haben festgestellt, dass eine einzige Verabreichung von Pneumovax® bei Patienten mit RA unter einer Therapie mit MTX einen bis zu zehn Jahre anhaltenden Schutz vor bakteriellen Pneumonien, welche durch Pneumokokken verursacht werden, garantiert. Allerdings gibt es keine objektiven Daten darüber, wann bei Patienten mit RA unter laufender Therapie mit MTX eine Auffrischungsimpfung gegen Pneumokokken stattfinden sollte [48].

2.4.3 TNF α - Inhibitoren

Der Einsatz von TNF α - Inhibitoren hat zu einem erheblichen Fortschritt in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis und anderer entzündlicher Arthropathien bzw. Autoimmunerkrankungen geführt [4] [51]. Diese Arbeit beschränkt sich auf die drei Hauptvertreter dieser Substanzklasse, nämlich *Etanercept*, *Infliximab* und *Adalimumab*. Etanercept besteht aus einem löslichen, rekombinanten TNF α - Rezeptor, während

Infliximab bzw. Adalimumab einen chimären bzw. humanen monoklonalen anti- TNF α -Antikörper darstellen. Mittlerweile sind zusätzlich zwei neue Wirkstoffe verfügbar, nämlich Golimumab und Certolizumab pegol [6].

In Bezug auf eine Therapie mit TNF α - Inhibitoren muss stets berücksichtigt werden, dass diese das Risiko für Infektionen, insbesondere für Infektionen der Atemwege, aber auch für Haut-, Weichteil-, Harnwegsinfektionen und septische Arthritiden, erhöht [6] [51]. TNF α wird von Makrophagen als Antwort auf entzündliche Stimuli sezerniert und übt zahlreiche Effekte auf die inflammatorische Kaskade und die Regulation der Immunantwort aus [4] [6]. TNF α aktiviert u.a. andere Entzündungszellen und stimuliert die Produktion von Zytokinen sowie die Phagozytose von Mykobakterien durch Makrophagen, sodass diesem Zytokin eine wichtige Rolle in der Abwehr von Viren und intrazellulären Mikroorganismen zukommt [6]. Gemäß Glück et al. [1] zeigen Patienten unter einer Therapie mit TNF α - Inhibitoren sogar eine höhere Infektionsrate als Patienten unter einer Therapie mit klassischen DMARDs. Die potentiellen Komplikationen einer Therapie mit TNF α - Inhibitoren umfassen bakterielle Infektionen, u.a. mit *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* oder atypischen Mykobakterien, sowie eine mögliche Reaktivierung von viralen Infektionen, u.a. von Hepatitis B, Hepatitis C oder Herpes zoster [6]. Eine TNF α - Inhibitoren- assoziierte Tuberkuloseinfektion basiert allerdings vorwiegend auf der Reaktivierung einer latenten Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis*, wobei das jeweilige Risiko unter Infliximab und Adalimumab höher ist als unter Etanercept. Dementsprechend ist es wichtig, vor Beginn einer Therapie mit TNF α - Inhibitoren ein adäquates Tuberkulose- Screening durchzuführen [6]. Näheres dazu ist in Kapitel 2.5.4 „Tuberkulose“ auf Seite 52ff. angeführt.

Zudem gilt eine Therapie mit TNF α - Inhibitoren als Risikofaktor für eine gesteigerte Mortalitätsrate bei Patienten, die mit *Streptococcus pneumoniae* infiziert sind [1]. In Mausexperimenten wurden erhöhte Werte an TNF α im Serum von Mäusen, die mit *Streptococcus pneumoniae* infiziert waren, beobachtet. Die Gabe von anti- TNF α resultierte in einem signifikanten Erregerzuwachs und gipfelte schließlich in einer erhöhten Todesrate [51]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TNF α eine wichtige Rolle bei der Clearance dieses Erregers zukommt [51].

Die routinemäßige Verabreichung des polyvalenten Pneumokokken- Polysaccharid- Impfstoffes bei Patienten unter einer Therapie mit TNF α - Inhibitoren ist empfehlenswert und der behandelnde Arzt sollte dafür eintreten, dass jeder Patient diese auch erhält [51].

Allerdings ist es durchaus möglich, dass sich eine Behandlung mit TNF α - Antagonisten negativ auf die Immunogenität des Pneumokokken- Impfstoffes auswirken könnte [51]. In diesem Zusammenhang spielt es eine große Rolle, um welche Art von TNF α - Antagonist es sich handelt, ob dieser alleine oder in Kombination mit MTX verwendet und welche Art von Impfstoff verabreicht wird [47]. Während die Kombination von bestimmten Impfstoffen mit bestimmten TNF α - Antagonisten eine reduzierte Stimulation des Immunsystems zur Folge hat, scheinen andere Substanzen aus der Gruppe der TNF α - Inhibitoren keinerlei negative Auswirkungen auf die Immunantwort auszuüben [47]. In der Literatur finden sich diesbezüglich z.T. widersprüchliche Ergebnisse- einige Studien berichten beispielsweise über eine reduzierte Immunantwort nach einer Impfung gegen Pneumokokken und Influenza bei Patienten unter einer Therapie mit TNF α - Inhibitoren im Vergleich zur Normalbevölkerung, während eine geringfügig höhere Anzahl an Studien vergleichbare Immunantworten zwischen Patienten unter einer Therapie mit TNF α - Inhibitoren und gesunden Probanden feststellt [4]. Leider ist die Anzahl an Variablen, die möglicherweise die unterschiedlichen Ergebnisse beeinflussen könnte, zu hoch, sodass ein direkter Vergleich der Studien unmöglich wird.

Ebenso gibt es unterschiedliche Empfehlungen hinsichtlich des optimalen Zeitpunktes für die Durchführung einer Pneumokokken- Impfung bei jenen Patienten, die mit TNF α - Antagonisten behandelt werden: So ist laut Kapetanovic et al. [19] eine Impfung gegen Pneumokokken unter einer laufenden Therapie mit TNF α - Antagonisten durchaus vertretbar (ganz im Gegensatz zu einer laufenden Therapie mit MTX), während gemäß Wright et al. [51] die Patienten bereits vor Therapiebeginn mit TNF α - Inhibitoren gegen Pneumokokken geimpft werden sollten. Zudem sollten bei diesen Personen alle fünf Jahre Auffrischungsimpfungen stattfinden, insbesondere bei Patienten mit suboptimaler Immunantwort. Eine Auffrischungsimpfung im Intervall kürzer als drei Jahre nach der ersten Impfung könnte zu schweren Nebenwirkungen führen, die aber nicht näher präzisiert werden [51].

Kaine et al. [52] haben in ihrer doppelblinden, randomisierten und multizentrischen Studie die Immunantwort nach einer Pneumokokken- Impfung bei adulten Patienten mit rheumatoider Arthritis unter einer Monotherapie mit **Adalimumab** mit jener der Placebogruppe verglichen und vier Wochen nach der Impfung ähnliche protektive Antikörperspiegel sowohl bei den RA- Patienten (85,9%) als auch den Personen aus der Placebogruppe (81,7%) festgestellt. Aufbauend auf diesen Ergebnissen kann davon

ausgegangen werden, dass jene Patienten, die an RA erkrankt sind und mit Adalimumab therapiert werden, effektiv gegen Pneumokokken geimpft werden können [52].

Ähnliche Ergebnisse liegen hinsichtlich einer Monotherapie mit **Infliximab oder Etanercept** vor. Die mittleren Antikörperspiegel nach einer Pneumokokken- Impfung sind bei Patienten mit RA unter einer Monotherapie mit Infliximab oder Etanercept mit jenen von Personen unter einer laufenden Therapie mit konventionellen DMARDs vergleichbar [53]. Allerdings tendieren Patienten, welche mit Infliximab oder Etanercept behandelt werden, generell zu einem geringeren Antikörperzuwachs (außer gegen den Pneumokokken- Serotyp 14) als die Personen aus der Kontrollgruppe, welche mit klassischen DMARDs behandelt werden. Zudem zeigen eine höhere Anzahl an Patienten unter einer Therapie mit den genannten TNF α - Antagonisten im Vergleich zur Kontrollgruppe kaum eine bzw. nur eine geringe Immunantwort nach der Exposition mit dem Pneumokokken- Impfstoff [53]. Es ist daher nicht auszuschließen, dass eine höhere Anzahl an Patienten mit RA unter einer Therapie mit Infliximab oder Etanercept im Vergleich zu jenen mit konventionellen DMARDs keine adäquate Immunantwort nach einer Pneumokokken- Impfung entwickeln könnte. Aus diesem Grund sollte eine Impfung gegen Pneumokokken bereits vor dem entsprechenden Therapiebeginn stattfinden [53].

Ferner haben einige Studien die Auswirkungen einer **Kombinationstherapie aus MTX und TNF α - Inhibitoren** auf die Immunantwort nach einer Pneumokokken- Impfung untersucht und kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Gemäß Visvanathan et al. [49] scheint die gemeinsame Gabe von MTX und Infliximab bzw. Etanercept die Immunantwort nicht zu beeinträchtigen [49]; zwar fallen die Immunantworten insgesamt geringer aus als es in der Normalbevölkerung zu erwarten wäre, aber es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit einer kombinierten Therapie aus MTX und Infliximab einerseits und den Patienten mit einer kombinierten Therapie aus MTX und Placebo andererseits festgestellt werden [49]. 80-85% der Patienten in dieser Studie, welche mit MTX und Infliximab behandelt wurden, zeigten eine Reaktion des Immunsystems gegen zumindest einen und 20-25% davon gegen mindestens sechs Pneumokokken- Serotypen [49]. Kapetanovic et al. [19] stellen im Gegensatz dazu fest, dass Patienten mit einer Monotherapie mit den TNF α - Inhibitoren Etanercept oder Infliximab bessere Immunantworten auf die Exposition mit den Pneumokokken- Serotypen 23F und 6B sowohl gegenüber Patienten mit einer kombinierten Therapie aus MTX und TNF α - Antagonisten als auch gegenüber jenen mit einer MTX- Monotherapie aufweisen [19]. Die kombinierte Therapie aus Adalimumab und MTX hingegen hat eine noch

geringere Stimulation des Immunsystems zur Folge als eine Monotherapie mit MTX, während eine Monotherapie mit Adalimumab keinerlei Auswirkungen auf die Immunreaktion nach einer Pneumokokken-Impfung ausübt [52].

2.4.4 Kortikosteroide

Bisher wurden die Auswirkungen von Kortikosteroiden auf die Wirksamkeit von Impfungen wenig untersucht, obwohl viele Patienten mit rheumatoider Arthritis oder anderen rheumatischen Erkrankungen zusätzlich zu einer Basistherapie mit immunsupprimierenden Medikamenten mit einer niedrig dosierten Dauertherapie an Kortikosteroiden (sog. „Low dose“) behandelt werden [1] [4]. Kortikosteroide üben potente immunmodulatorische Effekte an multiplen Schnittstellen des Immunsystems aus [4], verstärken den meist mit den DMARDs einhergehenden zytotoxischen Effekt und erhöhen in Abhängigkeit von der Dosis die Infektionsgefahr [1] [18]. Eine Therapie mit Prednisolone oder Äquivalent in einer Dosierung von über 20 mg pro Tag über mehr als zwei Wochen induziert eine klinisch signifikante Suppression des Immunsystems und geht somit mit einer erhöhten Infektionsgefahr einher, während eine tägliche Dosis unter 10 mg kein erhöhtes Infektionsrisiko zur Folge hat. Außerdem zeigt sich, dass eine Kombination von Kortikosteroiden und konventionellen DMARDs, beispielsweise MTX, Azathioprin oder Cyclosporin, die Infektneigung bei Patienten mit rheumatoider Arthritis deutlich erhöht [6]. So zeigt sich auch in einer retrospektiven Untersuchung, dass Patienten unter einer Therapie mit oralem Prednisone im Vergleich zur Normalbevölkerung in den vergangenen zehn Jahren deutlich öfter an einer bakteriellen Pneumonie, hervorgerufen durch *Streptococcus pneumoniae*, erkrankt sind [48].

Obwohl eine Therapie mit Kortikosteroiden zu einem erhöhten Infektionsrisiko beiträgt, scheint sie aber kaum oder nur geringe Auswirkungen auf die Wirksamkeit von Impfungen auszuüben. So zieht eine Behandlung mit Prednisolone in niedriger Dosierung zusätzlich zu MTX bzw. zusätzlich zu TNF α - Antagonisten keine Reduktion der Antikörperproduktion gegen die kapsulären Polysaccharide 23F und 6B nach einer Impfung gegen Pneumokokken mit sich [19]. Bingham et. al [54] konnten ebenso keinen signifikanten negativen Einfluss einer Therapie mit Kortikosteroiden auf die Immunantwort nach einer Impfung gegen Pneumokokken feststellen. Patienten im Alter unter 45 Jahren und Patienten mit einer zusätzlichen Therapie an Kortikosteroiden (zu Infliximab und/ oder MTX) zeigen sogar eine bessere Immunantwort als jene im Alter zwischen 45 und 65 Jahren ohne zusätzliche Therapie mit oralen Kortikosteroiden [49].

Auch bei Patienten mit chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen („Chronic obstructive pulmonary disease“, COPD) beeinflusst eine systemische Gabe von Prednisolone in einer Dosierung von über 10 mg pro Tag bzw. eine Therapie mit inhalativen Kortikosteroiden die spezifische Pneumokokken- Antikörperproduktion nach einer Impfung mit dem 23-valenten Pneumokokken- Impfstoff im Vergleich zu gesunden Personen nicht, wobei die Immunantworten gegen die Serotypen 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F jeweils drei und zwölf Monate nach der Pneumokokken- Impfung erfasst wurden [55]. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch bei Kindern mit nephrotischem Syndrom unter einer hoch dosierten Therapie an Kortikosteroiden. Kinder im Akutstadium der Erkrankung, bei denen direkt nach Initiierung einer hochdosierten Therapie mit Prednisone (d.h. 60 mg pro m² Körperoberfläche) eine Impfung mit dem 23- valenten Pneumokokken- Impfstoff durchgeführt wurde, zeigten eine vergleichbare Immunantwort ein Monat sowie ein Jahr nach der Impfung im Vergleich zu jenen Kindern, die sich zum Zeitpunkt der Pneumokokken- Impfung in der Phase der Remission befanden hatten [56].

2.4.5 Abatacept

Eine Behandlung mit Abatacept gilt bei Patienten mit rheumatoider Arthritis als Alternative zu einer erfolglosen Behandlung mit MTX oder TNF α - Inhibitoren. Das lösliche Fusionsprotein Abatacept besteht aus einer extrazellulären Domäne des humanen CTLA4- Moleküls („Cytotoxic T lymphocyte associated antigen“), die an einen modifizierten F_C- Anteil des menschlichen IgG₁ gebunden ist, sodass ein gentechnisch hergestelltes Konstrukt aus CTLA4 und Immunglobulin entsteht [6] [11]. Abatacept moduliert selektiv das CD80/CD86:CD28 kostimulatorische Signal, das für die Aktivierung der T- Zellen erforderlich ist, d.h. es bindet (so wie das natürliche CTLA4- Molekül) CD80 und CD86 mit einer höheren Avidität als CD28 und verhindert somit die über CD28- vermittelte Aktivierung der T- Zellen [6] [57]. Im Rahmen der physiologischen Immunantwort koppelt CD80 sowohl an CD28 als auch an das CTLA4- Molekül, wobei Letzteres ca. 16 bis 20 Stunden nach der Aktivierung der T- Lymphozyten exprimiert wird. Die Interaktion von CD80 mit CTLA4 ist viel affiner als die Bindung von CD80 an CD28 und stellt einen regulatorischen Mechanismus dar, der die Transkription von IL-2 hemmt und somit zur Anergieinduktion führt. Über CTLA4 wird somit ein negatives Signal an die angeregten T- Lymphozyten vermittelt [11]. Folglich beeinträchtigt eine Gabe von Abatacept die T- Zell- abhängige- Immunantwort, die beispielsweise durch eine Stimulation des Immunsystems mit Protein- Antigenen resultiert; während sie kaum

mit einer T- Zell- *unabhängigen* Immunreaktion interferiert, welche z.B. durch eine Exposition mit (Pneumokokken-) Polysacchariden induziert wird [1].

Im Rahmen der Literaturrecherche hat sich herausgestellt, dass bisher keine Studien verfügbar sind, welche die möglichen Auswirkungen von Abatacept auf die Wirksamkeit einer Impfung gegen Pneumokokken bei Patienten mit rheumatoider Arthritis untersuchen. Tay et. al [57] haben die Auswirkungen einer einzelnen intravenösen Gabe von 750 mg Abatacept auf die humorale Immunantwort nach einer Impfung mit dem Peptid- Antigen Tetanus- Toxoid und dem 23- valenten Pneumokokken- Impfstoff an *77 gesunden Personen* mit intaktem Immunsystem getestet. Die Studienteilnehmer wurden dabei in vier Gruppen unterteilt: In Gruppe A erfolgten die Impfungen jeweils *ohne* die Verabreichung von Abatacept, in Gruppe B jeweils *zwei Wochen vor* der Gabe von Abatacept, in Gruppe C jeweils *zwei Wochen nach* der Verabreichung von Abatacept und Personen der Gruppe D wurden *acht Wochen nach* der Infusion von Abatacept geimpft [57]. Die mittleren Antikörper- Titer für beide Impfstoffe waren unter Abatacept verringert: Über 60% der Studienteilnehmer, welchen Abatacept verabreicht wurde sowie 75% der Kontrollgruppe entwickelten eine positive Immunantwort gegen den Tetanusimpfstoff. Über 70% der Teilnehmer, welche Abatacept erhalten hatten, reagierten auf mindestens drei, sowie 25-30% davon auf mindestens sechs Pneumokokken- Serotypen¹⁰ im Vergleich zu jeweils 100% bzw. 45% aus der Kontrollgruppe [57]. Außerdem fällt auf, dass die Antikörpertiter gegen alle Pneumokokken- Serotypen- außer gegen 23F- in Gruppe C und D deutlich reduziert waren [57]. Der Zeitpunkt der Verabreichung des Medikamentes scheint somit von besonderer Bedeutung zu sein, denn jene Personen, die zwei Wochen nach Verabreichung von Abatacept geimpft worden waren, zeigten die geringste Immunantwort, während jene, die zwei Wochen vor der Gabe von Abatacept geimpft worden waren, am wenigsten beeinträchtigt waren [57].

Obwohl eine Gabe von Abatacept sowohl die Effektivität des Tetanus- Toxoides als auch des 23- valenten Pneumokokken- Polysaccharid- Impfstoffes beeinträchtigt, waren die gesunden Studienteilnehmer dennoch in der Lage, eine positive und somit klinisch signifikante Immunantwort (d.h. einen mindestens zweifachen Titeranstieg) gegen beide Impfstoffe zu entwickeln [57]. Ähnliche Ergebnisse können auch bei Patienten mit chronisch rheumatischen oder Autoimmunerkrankungen unter einer Therapie mit Abatacept erwartet werden [1], aber bislang sind diesbezüglich keine Studien verfügbar.

¹⁰ Die Antikörperproduktion gegen folgende Pneumokokken- Serotypen wurden untersucht: 2, 6B, 8, 9V, 14, 19F und 23F [57].

2.4.6 Rituximab

Der chimäre monoklonale Antikörper Rituximab ist gegen das B- Zell- spezifische Oberflächenantigen CD20 gerichtet und gilt als erfolgversprechende neue Therapiestrategie bei Patienten mit rheumatoider Arthritis [6] [58]. B- Lymphozyten können an der Initiierung und Aufrechterhaltung der inflammatorischen Kaskade im Rahmen einer rheumatoiden Arthritis beteiligt sein, indem sie Antigene an T- Zellen präsentieren und proinflammatorische Zytokine sowie autoreaktive Antikörper freisetzen [6]. Bevor Rituximab (RTX) zur Therapie der RA zugelassen wurde, hat sich dieses Medikament in der Behandlung von B- Zell- Lymphomen bewährt [4]. Durch die Bindung von RTX an CD20 kommt es über verschiedene Mechanismen, u.a. durch zellmedierte Zytotoxizität und Apoptose- Induktion, zur Depletion von diversen Subpopulationen an peripheren B- Zellen [6]. RTX führt zu einer rapiden Depletion von über 95% der CD20- positiven B- Zellen im Blut [45]. Obwohl Memory- B- Zellen einheitlich das Oberflächenantigen CD20 an ihrer Oberfläche exprimieren, scheint es so, als würden diese dem depletierenden Effekt von RTX entkommen können [45]- ebenso scheinen auch Plasmazellen nur wenig davon beeinträchtigt zu sein [1]. Die B- Zellen im Blut beginnen sich nach etwa sechs bis neun Monaten zu regenerieren, was sich durch das Auftreten einer vorwiegend unreifen (naiven) B- Zell- Population ankündigt [45]. Obwohl RTX zirkulierende B- Zellen hoch effektiv eliminiert, fällt seine Fähigkeit zur Depletion von B- Zellen in lymphatischen Geweben sehr variabel aus [4]. Im Blut befinden sich nur ca. 2% der B- Zellen, während im Knochenmark, in der Milz und den Lymphknoten- also dort, wo die Immunantwort stattfindet- die größte Anzahl an B- Zellen anzutreffen ist [45].

Eine Therapie mit RTX beeinträchtigt die Funktionen der B- Lymphozyten, sowohl hinsichtlich zellulärer als auch humoraler Abwehrmechanismen [58]. Der Mangel an B- Zellen, der nach der Verabreichung von RTX resultiert, kann zu einer fehlenden Aktivierung der T- Zellen führen [45], denn sobald CD20- positive B- Zellen in sekundären lymphatischen Geweben maximal eliminiert sind, ist die zur Produktion von Antikörpern erforderliche Interaktion mit den T- Zellen schwer beeinträchtigt. B- Zellen werden nämlich dadurch aktiviert, indem sie Antigene an T- Zellen mittels MCH II- Moleküle präsentieren und diese zur Sekretion von Zytokinen anregen, welche ihrerseits u.a. die Proliferation der B- Zellen in die Wege leiten [45]. Die langanhaltende B- Zell- Depletion durch RTX lässt eine eingeschränkte Antikörperproduktion nach Exposition mit bestimmten Impfstoffen vermuten [1]. Weitere Details hinsichtlich der Interaktion von B-

und T- Lymphozyten im Rahmen der physiologischen Immunantwort sind im Kapitel 2.3.3 „T- Zell- Stimulation und Zytokinexpression“ auf S. 20ff. angeführt.

Eine **Monotherapie mit RTX** beeinträchtigt die Induktion von Pneumokokken- und Influenza- spezifischen IgG- Antikörpern nach der jeweiligen Impfung signifikant [45]. In einer Studie wurden 19 Patienten mit RA gegen Influenza und Pneumokokken geimpft; einerseits sechs Tage vor der Verabreichung von RTX (sog. „prä- RTX- Gruppe“) und andererseits sechs Monate nach einer Therapie mit RTX (sog. „post- RTX- Gruppe“). Als Kontrollgruppe dienten zehn Patienten mit RA, die noch nie mit RTX behandelt worden waren [58]. Die prä- RTX- Gruppe entwickelte eine adäquate humorale Immunantwort sowohl gegen Protein- Antigene (Influenza) als auch gegen Polysaccharid- Antigene (Pneumokokken) [58] und die Produktion an Pneumokokken- spezifischen IgG- Antikörpern fiel in dieser Gruppe deutlich höher aus als in der post- RTX- Gruppe [58]. Wiederholte Gaben von RTX und eine vorausgegangene erfolglose Therapie mit TNF α - Antagonisten bei Patienten unter laufender Behandlung mit RTX übten allerdings keinen zusätzlichen negativen Effekt auf die Impfstoff- spezifische Immunantwort aus [58].

Bingham et al. [54] haben in ihrer randomisierten und kontrollierten Studie an 103 Patienten mit RA die Auswirkungen einer **kombinierten Therapie von RTX und MTX** auf die Immunantwort nach einer Impfung gegen Tetanustoxoid und Pneumokokken im Vergleich zu einer Monotherapie mit MTX untersucht. Der Pneumokokken- Impfstoff wurde dabei sieben Monate nach der Infusion von RTX verabreicht. Während die Immunantwort nach der Impfung mit dem Tetanustoxoid in beiden Gruppen ähnlich ausfiel (d.h. ein > 4facher Titeranstieg bei 39,1% der Patienten mit einer kombinierten Therapie aus RTX und MTX sowie bei 42,3% der Patienten mit einer MTX- Monotherapie), zeigte sich bei Patienten mit einer kombinierten Therapie aus RTX und MTX im Vergleich zu Patienten mit einer MTX- Monotherapie eine eingeschränkte Stimulation des Immunsystems nach Exposition mit dem 23- valenten Pneumokokken- Polysaccharid- Impfstoff [54]. Trotz peripherer B- Zell- Depletion war eine gewisse Immunantwort gegen Pneumokokken (die ja B- Zell- abhängig ist) bei Patienten unter kombinierter Therapie aus RTX und MTX nachweisbar: 57% zeigten eine Immunantwort, d.h. einen mindestens zweifachen Titeranstieg, gegen mindestens einen der zwölf getesteten Pneumokokken- Serotypen¹¹ (im Vergleich zu 82% der Patienten mit einer MTX- Monotherapie) und 43% davon gegen mindestens zwei Serotypen [54]- was darauf hinweist, dass Patienten mit RA unter kombinierter Therapie von RTX und MTX durchaus

¹¹ Die Antikörperproduktion gegen die Pneumokokken- Serotypen 1, 3, 4, 6B, 8, 9N, 12F, 14, 19F, 23F, 7F und 18C wurden untersucht [54].

eine positive Immunreaktion entwickeln können [54]. Um den Erfolg von Polysaccharid-Impfstoffen zu erhöhen, sollte deren Verabreichung allerdings bereits vor Therapiebeginn mit RTX erfolgen- oder mit einem größtmöglichen zeitlichen Abstand zur Gabe von RTX; optimal wäre zum Zeitpunkt der beginnenden Repopulation an B- Zellen [54].

2.5 Vergleich mit anderen Impfstoffen

Im Folgenden sollen die immunologischen Auswirkungen der Protein- basierten Impfstoffe gegen Influenza und Hepatitis B sowie der Lebendimpfstoffe Masern- Mumps- Röteln und Varizella zoster bei Patienten mit RA unter immunsuppressiver Therapie dargestellt und somit ein Vergleich zu jenen der in den vorhergehenden Kapiteln angeführten Polysaccharid- basierten Pneumokokken- Impfstoffe geschaffen werden. Allerdings hat sich im Rahmen der Literaturrecherche herausgestellt, dass in diesem Kontext kaum Studien in Bezug auf die Auswirkungen einer Dauertherapie mit Rituximab bzw. Abatacept vorliegen.

Außerdem wird kurz auf das Risiko einer Tuberkulose (TBC)- Infektion bei supprimiertem Immunsystem und die Notwendigkeit eines vorab durchgeführten TBC- Screenings sowie die aktuellen Bestrebungen zur Entwicklung von neuen, protektiven Impfstoffen gegen *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) eingegangen.

2.5.1 Influenza

Eine jährliche Impfung gegen Influenza wird Personen über 60 Jahren, Patienten mit chronischen Erkrankungen sowie immunsupprimierten Personen empfohlen [1]. Zahlreiche Studien haben die Auswirkungen der Influenza- Impfung an Patienten unter einer Therapie mit traditionellen DMARDs untersucht- wobei berücksichtigt werden sollte, dass all diese Studien mit *inaktivierten* Influenza- Impfstoffen durchgeführt wurden [1]. Eine Impfung gegen Influenza führt bei den meisten Patienten mit rheumatoider Arthritis zu einer guten, aber dennoch geringeren Immunantwort als in der Normalbevölkerung [59] [60], wobei eine Therapie mit konventionellen DMARDs (einschließlich MTX), Infliximab und Kortikosteroiden wenig Einfluss auf die Wirksamkeit der Influenza- Impfung ausübt [59]- unter der Voraussetzung, dass die Patienten eine geringe und/oder stabile Krankheitsaktivität zum Zeitpunkt der Verabreichung des Impfstoffes aufweisen [60]. Zudem geht eine Impfung gegen Influenza mit keiner klinischen Verschlechterung der zugrundeliegenden rheumatischen Erkrankung einher [59] [60] [61]. Die variable

(saisonale) Zusammensetzung der jeweiligen Influenza- Impfstoffe ist an dieser Stelle nicht explizit angeführt und ist dementsprechend den angeführten Studien zu entnehmen.

Eine Therapie mit MTX beeinträchtigt die Wirksamkeit der Influenza- Impfung bei Patienten mit rheumatoider Arthritis nicht [59]; die mittleren Influenza- spezifischen Antikörper- Spiegel bei Patienten unter einer Therapie mit MTX nehmen nach der entsprechenden Impfung deutlich zu [62]. Eine Impfung gegen Influenza wird gut toleriert und erweist sich als effektiv, auch unter einer Therapie mit MTX [47].

Ähnliche Ergebnisse liegen hinsichtlich einer Dauertherapie mit Adalimumab vor: Patienten, die mit Adalimumab behandelt werden, können sicher und effektiv gegen Influenza geimpft werden [52]. Die Immunantworten dieser Patienten nach einer Influenza- Impfung (73,3%) sind mit denen aus der Placebo- Gruppe vergleichbar (73,9%) [52]. Zudem weisen sogar 98% der Patienten unter einer Therapie mit Adalimumab protektive Antikörper- Spiegel im Vergleich zu 94,5% der Personen aus der Placebo- Gruppe auf [52]. Ebenso führt eine Therapie mit Etanercept oder Infliximab zu keiner eingeschränkten Induktion an Influenza- spezifischen Antikörpern [59].

Im Gegensatz dazu beeinträchtigt eine Therapie mit RTX die humoralen Abwehrmechanismen gegen eine Influenza- Impfung bei Patienten mit RA signifikant, wobei die Krankheitsaktivität der rheumatischen Grunderkrankung aber unverändert bleibt [62] [63]. Wenn eine Impfung gegen Influenza sechs bis zehn Monate nach Verabreichung von RTX erfolgt, zeigen sich geringfügig bessere Immunantworten im Vergleich zu einer Impfung, die vier bis acht Wochen nach der Gabe von RTX stattfindet. Dies ist auf die beginnende Repopulation an B- Zellen, die ca. sechs bis zehn Monate nach der Verabreichung des Medikamentes ihren Anfang nimmt, zurückzuführen [62]. Selbst ein geringer Zuwachs an Influenza- spezifischen Antikörpern könnte bereits einen gewissen Schutz vor einer Infektion garantieren [62]. Obwohl eine Behandlung mit RTX eine eingeschränkte Immunantwort nach einer Influenza- Impfung mit sich zieht, sollte dennoch bei Personen unter einer Therapie mit RTX nicht auf eine jährliche Impfung gegen Influenza verzichtet werden [62] [63].

In einer Studie mit insgesamt 149 Patienten mit rheumatoider Arthritis sowie anderen immunmedierten Erkrankungen (u.a. Vaskulitiden) wurde festgestellt, dass sich eine Therapie mit Abatacept negativ auf die Immunantwort nach einer Influenza- Impfung auswirkt, während eine Behandlung mit Glukokortikoiden und konventionellen DMARDs zu keiner Beeinträchtigung der Influenza- spezifischen Immunantwort führt [46].

2.5.2 Hepatitis B

Die Reaktivierung einer latenten chronischen Infektion mit dem Hepatitis B- Virus (HBV) kann bei immunsupprimierten Patienten zu einer akuten Hepatitis, in seltenen Fällen und unter hochgradiger Immunsuppression auch zu einer fulminanten Hepatitis führen und somit eine lebensbedrohliche Komplikation darstellen [1] [64]. Insbesondere bei einer Langzeit- Therapie mit TNF α - Inhibitoren besteht ein gewisses Risiko für die Reaktivierung einer HBV- Infektion, wobei dies v.a. auf Infliximab, weniger auf Etanercept oder Adalimumab, zutrifft [6]. Daher ist die Durchführung einer Impfung gegen HBV vor dem Therapiebeginn mit immunmodulierenden Medikamenten von besonderer Relevanz [1] [64]. Vor Beginn einer immunsuppressiven Therapie sollten folglich alle Patienten hinsichtlich einer Infektion mit HBV sowie ihr aktueller Impfstatus gegen HBV, also die Laborwerte HBsAg (Hepatitis- B- surface- antigen), anti- HBs (Antikörper gegen das HBs- Antigen) und anti- HBc (Antikörper gegen das Hepatitis- B- core- Antigen), abgeklärt werden [6] [64]. Allerdings gibt es *keine* Empfehlungen für eine Impfung gegen HBV bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen unter einer *laufenden* Therapie mit DMARDs [47]. Eine Impfung gegen HBV könnte potentiell den Ausbruch oder eine Verschlechterung einer rheumatoiden Arthritis und anderer Autoimmunerkrankungen, so z.B. Multiple Sklerose, Vaskulitis oder Neuritis optica, triggern [65] [66], wobei dies aber eine sehr seltene Komplikation darstellt und die Vorteile einer HBV- Impfung eindeutig gegenüber den möglichen Nebenwirkungen überwiegen [66].

Im Rahmen der Literaturrecherche konnten generell nur wenige Studien ausfindig gemacht werden, die sich mit den Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlichen Immunsuppressiva- Klassen und dem HBV- Impfstoff bei Patienten mit rheumatoider Arthritis befassen. Elkayam et al. [65] kommen beispielsweise in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass eine Impfung gegen HBV bei 68% der Studienteilnehmer mit rheumatoider Arthritis zu einer protektiven Antikörperproduktion führt und mit keiner Verschlechterung der rheumatischen Grunderkrankung einhergeht [65]. Eine Therapie mit traditionellen DMARDs übt bei Personen mit rheumatoider Arthritis keinen negativen Einfluss auf die Effektivität einer HBV- Impfung aus; allerdings führt im Gegensatz dazu eine Behandlung mit dem TNF α - Antagonisten Etanercept bzw. die Kombinationsbehandlung aus Etanercept und MTX zu einer signifikant reduzierten Immunantwort nach Verabreichung des HBV- Impfstoffes [50]. Die Auswirkungen von weiteren immunsupprimierenden Medikamenten, insbesondere Ritiximab, Abatacept und anderen Biologicals, auf die Wirksamkeit einer HBV- Impfung sind bisher noch nicht näher untersucht worden [50].

2.5.3 Lebendimpfstoffe

Lebendimpfstoffe ahmen eine natürliche Infektion nach und verleihen im Gegensatz zu Totimpfstoffen eine langanhaltende Immunität [4] [50]. Die Gabe von Lebendimpfstoffen stellt aber ein besonderes Risiko für immunsupprimierte Patienten dar [1] [4], was vermutlich auch vom Grad der Immunsuppression abhängt [1]. Generell ist eine Verabreichung von Lebendimpfstoffen, wie z.B. die Impfstoffe gegen Poliomyelitis, Masern- Mumps- Röteln, Varizella zoster oder Gelbfieber, an Patienten unter immunsuppressiver Therapie *kontraindiziert* [4] [6] [50]. Immunsupprimierte Patienten sind nicht in der Lage, eine adäquate Immunantwort gegen das Virus zu entwickeln und zeigen ein erhöhtes Risiko einer verstärkten Virusreplikation, welche zu einer schweren Impfkrankheit oder gar zu einer Persistenz des Virus führen kann [50]. Außerdem empfiehlt sich Zurückhaltung hinsichtlich der Verabreichung von Lebendimpfstoffen an Personen, welche zusammen mit immunsupprimierten Menschen in einem Haushalt leben, da für Letztere ein hohes Infektionsrisiko durch eine mögliche Transmission des Virus besteht [50]. Lebendimpfstoffe müssen drei bis vier Wochen vor Beginn bzw. Neustart einer immunsuppressiven Therapie verabreicht werden [50]. Die Dauer der Unterbrechung einer laufenden immunsuppressiven Therapie, um eine sichere Verabreichung eines Lebendimpfstoffes durchführen zu können, hängt ab von der Art, Dosis und Dauer der Immunsuppression. Prinzipiell geht man davon aus, dass das Immunsystem ca. drei Monate braucht, um sich völlig zu erholen- für Kortikosteroide hingegen scheint aber auch die Dauer von einem Monat ausreichend zu sein, während für RTX wahrscheinlich eine Zeitspanne von sechs bis zehn Monaten erforderlich ist [6] [50].

Obwohl die Verabreichung von Lebendimpfstoffen an immunsupprimierte Patienten generell kontraindiziert ist [4] [6] [50], kommen einige wenige Studien zu dem Ergebnis, dass eine Applikation der Lebendimpfstoffe Masern- Mumps- Röteln und Varicella zoster bei immunsupprimierten Patienten unter bestimmten Voraussetzungen keine negativen Folgen nach sich zieht [67] [68]. Eine Impfung mit dem Lebendimpfstoff Varizella zoster wird Patienten mit einer niedrigen bis moderaten Suppression des Immunsystems sogar empfohlen [68]. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Folgenden erörtert.

Generell sind nur wenige Daten hinsichtlich der potentiellen Wechselwirkungen zwischen einem supprimiertem Immunsystem und der Impfung gegen **Masern- Mumps- Röteln** (MMR) verfügbar. Eine zweifache MMR-Impfung ist für Kinder ab dem ersten Lebensjahr empfohlen [1]. Heijstek et al. [67] haben in ihrer retrospektiven und multizentrischen Kohortenstudie bei 207 Kindern mit juveniler idiopathischer Arthritis, einer Sonderform

der rheumatoiden Arthritis, beobachtet, dass es sechs Monate nach einer Impfung gegen MMR weder zu Nebenwirkungen noch zu einem Anstieg der Krankheitsaktivität, unabhängig vom Gebrauch von MTX, gekommen war [67]. Ähnliche Ergebnisse wurden nach Impfungen gegen MMR bei Kindern nach Knochenmarks- oder Organ-Transplantation und bei HIV- positiven Kindern, wobei bei Letzteren keine schwereren Immundefekte vorlagen, nachgewiesen [1]. Protektive Antikörper- Titer nach einer Impfung gegen MMR können somit laut Glück et al. [1] bei 70- 90% dieser Patienten erwartet werden.

2.5.3.1 Varizella zoster

Patienten mit langanhaltender immunsuppressiver Therapie sind einem erhöhten Risiko für Herpes zoster- Infektionen ausgesetzt [1] [68]. Diese basieren auf der Reaktivierung einer latent persistierenden Infektion des Varizella zoster- Virus (VZV) in sensorischen Ganglien und sind durch eine unilaterale radikuläre Schmerzsymptomatik sowie ein auf ein Dermatom begrenztes, bläschenförmiges Exanthem charakterisiert. Eine postherpetische Neuralgie, die durch neuropathische Schmerzen sowie Dyskomfort (d.h. Allodynie oder schweren Juckreiz) Wochen oder Monate, ja sogar Jahre nach Abheilung des Exanthems gekennzeichnet ist, gilt als gefürchtete Spätkomplikation [69].

Centers for Disease Control Advisory Committee on Immunisation empfehlen die Impfung gegen VZV mit dem *abgeschwächten* Lebendimpfstoff (Stamm Oka/ Merck) allen Personen über 60 Jahren, einschließlich Patienten mit laufender immunsuppressiver Therapie- aber letzteres nur unter gewissen Voraussetzungen [68]. Patienten mit einer niedrigen bis moderaten Immunsuppression können sicher gegen VZV geimpft werden. So stellt eine niedrig dosierte Therapie mit Kortikosteroiden (d.h. <20 mg pro Tag Prednison oder Äquivalent), Methotrexat (≤ 0.4 mg pro kg Körpergewicht pro Woche), Azathioprin (≤ 3.0 mg pro kg Körpergewicht pro Tag), oder 6-Mercaptopurin (≤ 1.5 mg pro kg Körpergewicht pro Tag) keine Kontraindikation für die Verabreichung des VZV- Impfstoffes dar [68]. Ideal wäre natürlich die Verabreichung des VZV- Impfstoffes zwei Wochen, vorzugsweise vier Wochen, vor geplantem Beginn der immunsuppressiven Therapie [68]. Die Auswirkungen einer Therapie mit Biologicals, insbesondere der TNF α - Inhibitoren (Adalimumab, Infliximab und Etanercept), auf die Immunantwort nach einer Impfung gegen VZV ist unklar [4] [68]. Daher sollte eine Impfung gegen VZV vor Therapiebeginn mit TNF α - Inhibitoren durchgeführt werden- oder nach einer Unterbrechung derselben im Ausmaß von mindestens einem Monat [68].

Zukünftige Studien werden benötigt, welche die Effektivität der aktuell lizenzierten VZV-Impfstoffe bei Patienten mit moderater Immunsuppression analysieren [69]. Zudem befassen sich aktuell bereits einige Studien mit der Entwicklung von *inaktivierten* VZV-Impfstoffen, welche eine Immunisierung von *hochgradig* immunsupprimierten Patienten ermöglichen könnten [69].

2.5.4 Tuberkulose

Eine Therapie mit immunsupprimierenden Medikamenten ist mit einem erhöhten Risiko für Tuberkulose (TBC)- Infektionen assoziiert, welches vorwiegend auf eine Reaktivierung einer latenten tuberkulösen Infektion (LTBI) zurückzuführen ist [6]. Dies gilt insbesondere für die Behandlung mit TNF α - Inhibitoren (siehe dazu Kapitel 2.4.3 „TNF α - Inhibitoren“ auf S.38f) und anderen Biologicals, aber auch für jene mit konventionellen Basistherapeutika und Kortikosteroiden. Das TBC- Risiko fällt nicht nur zwischen den unterschiedlichen Immunsuppressiva, sondern auch innerhalb ein und derselben Medikamentenklasse jeweils unterschiedlich aus. So z.B. geht eine Dauertherapie mit Etanercept mit einem geringeren Risiko einer TBC- Reaktivierung im Vergleich zu Infliximab und Adalimumab einher [6]. Hinsichtlich einer Dauertherapie mit Abatacept bzw. Rituximab liegen in diesem Zusammenhang allerdings kaum Daten vor [6]. Daher kommt der Prophylaxe von potentiellen Tuberkuloseinfektionen, u.a. durch ein entsprechendes Tuberkulose- Screening vor Beginn einer immunmodulierenden Behandlung (v.a. mit Biologicals), eine große Bedeutung zu [6] [70]. Zur Zeit existiert allerdings keine Gold- Standard- Methode zur Diagnostik einer LTBI [70]. Der Tuberkulin- Hauttest (THT) stellt das klassische in vivo TBC- Screeningverfahren dar- ist aber u.a. bei immunsupprimierten Personen, so auch bei Patienten mit RA, wenig aussagekräftig. Als Alternative zum THT können IFN γ - Release- Assays (IGRA) ex vivo durchgeführt werden. Falls das TBC- Screening positiv ausfällt, sollte eine aktive Infektion u.a. mittels Thorax- Röntgenaufnahmen ausgeschlossen und – je nach Vorliegen von zusätzlichen Risikofaktoren- eine entsprechende Chemoprophylaxe (d.h. Isoniazid für neun Monate oder alternativ Rifampicin für vier Monate) eingeleitet werden [6] [18]. Allerdings ist nach wie vor unklar, wieviele Personen mit einem positiven Screening- Test wirklich mit *M. tuberculosis* infiziert bleiben und wie lange ein positives Testergebnis bei diesen Personen nachweisbar ist [6]. Näheres zu den TBC- Screeningverfahren, insbesondere hinsichtlich IGRA, ist in den folgenden Kapiteln angeführt. Bezüglich Pathogenese,

Klinik, Stadieneinteilung, Differentialdiagnosen und Therapie einer TBC- Infektion wird auf weiterführende Literatur verwiesen.

Der abgeschwächte Lebendimpfstoff „Bacille Calmette- Guérin“ (BCG- Impfstoff) stellt aktuell den einzigen lizenzierten Impfstoff zur Prophylaxe von TBC- Infektionen dar und findet auch heute noch eine routinemäßige Verwendung in vielen Ländern, in denen TBC- Infektionen endemisch auftreten, obwohl die Effektivität des BCG- Impfstoffes je nach Studie und Region zwischen 0% und 80% variiert [7] [71]. Diese extreme Variabilität kann auf bestimmte Genmutationen, eine rapide Clearance des BCG- Impfstoffes, eine Exposition mit anderen Mykobakterien oder auf die unterschiedliche Zusammensetzung des jeweiligen Zellkulturmediums zur Herstellung des BCG- Impfstoffes zurückgeführt werden [7] [71]. Zudem hält der schützende Effekt des BCG- Impfstoffes nicht dauerhaft an, d.h. nach zehn Jahren beträgt dessen Effektivität im Durchschnitt nur mehr 14% [7]. Aus den genannten Gründen scheint der BCG- Impfstoff kaum in der Lage zu sein, einen effektiven Schutz vor TBC- Infektionen zu bieten, sodass dringend neue Impf- Strategien benötigt werden. Seit dem Jahr 1998 wird die Verabreichung des BCG- Impfstoffes in Deutschland von der Ständigen Impfkommission des Robert Koch Institutes nicht mehr empfohlen [18].

Laut Schätzungen ist weltweit etwa ein Drittel der Bevölkerung mit Mycobacterium tuberculosis infiziert, wobei ca. 10% bis 15% davon, insbesondere bestimmte Risikogruppen, u.a. ältere Menschen, immunsupprimierte oder HIV- infizierte Personen, im Laufe ihres Lebens eine aktive Tuberkulose- Infektion entwickeln [16] [18]. Die Inzidenz an TBC- Infektionen ist in den Industriestaaten in den vergangenen Jahren kontinuierlich rückläufig und beträgt beispielsweise in Zentral- und Westeuropa durchschnittlich 10- 50 pro 100.000 Einwohner pro Jahr, während TBC- Erkrankungen in den Entwicklungsländern nach wie vor zu den häufigsten Infektionserkrankungen zählen und pro Jahr fast zwei Millionen Tote fordern [18]. Außerdem lässt sich in zunehmendem Ausmaß das Auftreten von multiresistenten (MDR: Multidrug resistant tuberculosis) sowie von hoch resistenten Tuberkulose- Stämmen (XDR: Extremely drug resistant tuberculosis) beobachten [18]. Zur Zeit befassen sich viele Studien mit der Entwicklung von neuen Tuberkulose-Impfstoffen [7] [8], welche die Wirksamkeit des bestehenden BCG- Impfstoffes verbessern bzw. diesen völlig ersetzen sollen [7]. So z.B. gilt das Antigen „MVA85A“ („Modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A“) als erfolgversprechender Prototyp für zukünftige Impfstoffe gegen TBC- Infektionen, zumal es eine hohe Immunogenität sowohl bei Personen mit einer bestehenden latenten

Tuberkuloseinfektion als auch bei HIV- infizierten Personen aufweist, ohne bei Letzteren eine Verminderung der Anzahl der CD4- positiven T- Zellen noch eine Zunahme der Viruslast hervorzurufen. Dieser Teilaspekt ist von besonderer Bedeutung, da bei einer HIV- Infektion oft auch gleichzeitig eine Koinfektion mit TBC besteht [8]. Zudem führt MVA85A neben der Produktion von Antigen- spezifischen IFN γ - sezernierenden CD4- positiven Zellen auch zu einer Stimulation von Memory- Zellen [7]. Auf die weiteren, vielfältigen Strategien zur Entwicklung von neuen TBC- Impfstoffen wird in dieser Arbeit nicht näher eingegangen; diesbezüglich wird an andere Stellen verwiesen [7] [8]. Zukünftige Studien werden zeigen, ob sich das Antigen MVA85A bzw. andere Prototypen als valide Impfstoffe gegen *Mycobacterium tuberculosis* bewähren können [8].

In der Literatur finden sich kaum Daten hinsichtlich der Wechselwirkungen zwischen dem BCG- Impfstoff und einer immunsupprimierenden Therapie bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. Eine Impfung mit dem BCG-Impfstoff soll unter einer laufenden Therapie mit TNF α - Inhibitoren vermieden werden, da die möglichen Nebenwirkungen bei diesen Patienten nicht vorabsehbar sind [72]. In einem Case Report [72] wird der Fall einer versehentlichen Verabreichung des BCG- Impfstoffes an eine 24- jährigen Patientin mit rheumatoider Arthritis unter einer laufenden Therapie mit Infliximab (in einer Dosierung von 3 mg pro kg Körpergewicht) beschrieben. Obwohl die Patientin drei Wochen nach der Impfung keine Beschwerden aufwies und weder Sputumkultur noch Thorax- Röntgenbild pathologische Veränderungen zeigten, wurde eine präventive Behandlung mit Isoniazid in einer Dosierung von 4 mg pro kg Körpergewicht für die Dauer von zwei Monaten eingeleitet. Auch neun Monate nach der Impfung blieb die Patientin klinisch unauffällig, wobei unklar ist, ob dies entweder auf einen BCG- Stamm mit geringer Virulenz oder auf die Behandlung mit Isoniazid zurückzuführen ist [72]. Daher ist im Falle einer akzidentellen BCG- Verabreichung an Personen mit einer Dauertherapie an TNF α - Inhibitoren die Durchführung einer anti- TBC- Prophylaxe stark empfehlenswert, wobei die Auswahl des Tuberkulostatikums von dem jeweiligen BCG- Stamm abhängt [72].

Während die Produktion von Antikörpern im Rahmen von Pneumokokken- Infektionen eine entscheidende Rolle spielt [34], kommt einer T- Zell- vermittelten Effektorantwort bei TBC- Infektionen und auch bei bestimmten anderen Erkrankungen, so z.B. HIV oder Malaria, eine große Bedeutung zu [12]. Die Immunantwort nach der Exposition mit den Tuberkelbakterien umfasst primär eine zellvermittelte Reaktion, die mit einer Sensibilisierung von T- Lymphozyten gegen *Mycobacterium tuberculosis*- assoziierte Antigene einhergeht [16]. CD4- positive Zellen mit einem TH₁- basierten Zytokinprofil

sind für einen Schutz vor einer Tuberkuloseinfektion von entscheidender Bedeutung, wobei das jeweilige Zytokinprofil einen Hinweis auf die Viruslast geben kann [15]. So korreliert das Vorhandensein von poly- bzw. multifunktionellen CD4- positiven Zellen, welche simultan die Zytokine IFN γ , IL-2 und TNF α sezernieren, in 85% bis 90% mit einer *akuten* TBC- Infektion, während dies nur in 10% bis 15% bei Patienten mit einer latenten tuberkulösen Infektion der Fall ist [15]. Multifunktionelle CD4- positive T- Zellen scheinen somit zu keiner effektiven Kontrolle einer TBC- Infektion beizutragen [71]. Bei einer *latenten* TBC- Infektion hingegen zeigt das Zytokinprofil der CD4- positiven T- Zellen eine überwiegende Sekretion von IFN γ bzw. von IFN γ in Kombination mit IL-2 [15]. Außerdem sinkt durch den Einsatz einer antimikrobiellen Therapie bei Patienten mit einer akuten TBC- Infektion die Anzahl an multifunktionellen T- Zellen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Zytokinprofile der CD4- positiven Zellen mit dem Immunstatus des jeweiligen Patienten korrelieren bzw. als nützliche Hilfsmittel zur Überwachung der Wirksamkeit einer tuberkulostatischen Behandlung herangezogen werden könnten [15]. In den anschließenden Kapiteln wird die spezifische zellvermittelte Immunantwort gegen Mycobacterium tuberculosis- assoziierte Antigene bei Patienten mit LTBI bzw. aktiver TBC- Infektion evaluiert und mit jener von gesunden Probanden verglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Vorstellung des Projektes/ Zielsetzung

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln am Beispiel der rheumatoiden Arthritis erwähnt, ist die Bestimmung der zellulären (bzw. humoralen) Antigen- spezifischen Immunantwort bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen bzw. immunsupprimierten Personen zur Prophylaxe bzw. Kontrolle von verschiedenen Infektionen im klinischen Alltag von besonderer Bedeutung. Anhand dieses Projektes, dessen Schwerpunkt die Analyse der spezifischen Funktionen der T- Lymphozyten mithilfe von ELISpot- Assays darstellt, soll die Aussagekraft der bisher verfügbaren diagnostischen in vitro- Methoden zur TBC- Diagnostik in Hinblick auf die Mechanismen der zellvermittelten Primär- und Sekundärantwort u.a. bei diesen Risikogruppen erweitert werden. Außerdem soll untersucht werden, ob anhand der gemessenen Zytokinprofile (mono- bzw. polyfunktionelle T- Lymphozyten) Rückschlüsse auf die jeweilige Krankheitsaktivität der TBC- Infektion bzw. den jeweiligen Immunstatus der Studienteilnehmer- unter Berücksichtigung der klinischen Symptomatik und anderer medizinischer bzw. diagnostischer Untersuchungen sowie einer entsprechenden Risikobeurteilungsvorgenommen werden könnten. Die etablierte Methodik des **T- SPOT.TB™** (Oxford Immunotec) wurde als Referenzmethode für diese Arbeit ausgewählt und repräsentiert das Grundprinzip der ELISpot- Methodik. Die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit könnten in Zukunft analog auch auf andere ELISpot- Assays, die sich bereits in der Praxis bewährt haben, übertragen werden und somit allgemein zum Ausbau des Anwendungsgebietes der ELISpot- Methodik beitragen. Zur Zeit ist meines Erachtens kein Pneumokokken- spezifisches ELISpot- Assay kommerziell verfügbar und die Entwicklung bzw. Implementierung desselben würde den Rahmen dieser Diplomarbeit sowohl im Bezug auf den zeitlichen als auch technischen Aufwand sprengen.

Im Rahmen dieses Projektes wird die zellmedierte spezifische Immunantwort von insgesamt zehn Personen- sieben Patienten mit LTBI bzw. aktiver TBC und drei gesunde Probanden- jeweils separat sowohl mittels **T- SPOT.TB™** (Oxford Immunotec), als auch anhand **Dual- Color- ELISpot** (R&D Systems) untersucht. Minderjährige und Schwangere sind von den Erhebungen ausgeschlossen. Sowohl die unterschiedlichen Gruppen an Studienteilnehmern als auch beide Immunoassays werden hinsichtlich der erhobenen Daten miteinander verglichen. Die etablierte Methode des T-SPOT.TB™ (Oxford Immunotec) dient zur Bestimmung von in vitro aktivierten, IFN γ - sezernierenden

T- Effektorzellen gegen spezielle Mycobacterium tuberculosis- assoziierte Antigene und somit zur Unterstützung bzw. Absicherung der Diagnosefindung bei Patienten mit Verdacht auf eine (latente bzw. akute) Tuberkuloseinfektion [16]. Das Zytokin IFN γ spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der zellmedierten Immunantwort gegen Infektionen mit M. tuberculosis [73]. Das Dual- Color- ELISpot- Assay (R&D Systems) hingegen stellt eine neue bzw. adaptierte Version der Single- Color-ELISpot- Technik zum *simultanen* Nachweis der Zytokine IFN γ und IL-2 dar, anhand der sowohl mono- als auch polyfunktionelle T-Lymphozyten erfasst werden können [17].

Zur Diagnostik einer **Tuberkuloseinfektion** werden neben Anamnese, Klinik, individueller Risikobeurteilung der betroffenen Person (z.B. Vorliegen einer HIV-Erkrankung bzw. anderer Immundefekte oder Kontakt zu einem Patienten mit offener Tuberkulose), Thorax- Röntgenaufnahmen, bakteriologischen Untersuchungen und Tuberkulin- Hauttests (THT) auch sog. „IFN γ - Release- Assays“ (IGRA) herangezogen [18]. Beim **THT** bzw. Intrakutantest nach Mendel- Mantoux wird das von der WHO als Referenz-Tuberkulin deklarierte dänische Tuberkulin PPD RT₂₃ in einer Standarddosis von zwei Einheiten in 0,1 ml intrakutan am Unterarm injiziert. Nach 72 Stunden wird das Ergebnis abgelesen, wobei die Verhärtung der Haut rund um die Einstichstelle hinsichtlich Stärke und Durchmesser, nicht aber die Rötung an sich beurteilt wird [18]. Ein positives Ergebnis, d.h. eine Induration von >5 mm, spricht für eine Tuberkuloseinfektion; eine starke Reaktion von >15 mm für eine therapiebedürftige Tuberkuloseerkrankung. Umgekehrt ist das Vorliegen einer Tuberkuloseinfektion unwahrscheinlich, wenn der THT negativ ausfällt- wobei aber stets beachtet werden soll, dass die Sensitivität des THT nur bei ca. 70% liegt. Zudem können aber auch falsch positive Ergebnisse, bedingt durch eine Kreuzreaktion mit einer stattgefundenen BCG- Impfung oder mit anderen Umweltmykobakterien vorkommen [18]. Im Vergleich zu den Tuberkulin- Hauttests (THT) weisen **IFN γ - Release- Assays** (IGRA) sowohl eine höhere Sensitivität als auch eine höhere Spezifität auf [16] [18]. Außerdem wird dieses in vitro- Testverfahren kaum von einer immunsupprimierenden Dauertherapie [6] [70], noch von dem BCG- Impfstoff bzw. den meisten „nicht- tuberkulösen“ Mykobakterien beeinflusst und kann als Bestätigungstest bzw. ergänzender Test zum THT- insbesondere bei einem positiven bzw. bei einem unklaren Ergebnis des THT, aber auch bei einem begründeten Verdacht auf eine falsch negative Reaktion- eingesetzt werden [18]. Der **QuantiFERON- TB Gold In-Tube- Test** (QFT™, Cellestis) und der **T- SPOT.TB™** (Oxford Immunotec) stellen zwei

kommerziell erhältliche Interferon γ - Release- Assays (IGRA) dar und beruhen zwar auf demselben Grundprinzip, nämlich dem Nachweis von $\text{IFN}\gamma$ - sezernierenden T-Effektorzellen gegen spezielle Mycobacterium tuberculosis- assoziierte Antigene (siehe unten), allerdings weisen beide Verfahren einen unterschiedlichen Testablauf und somit auch unterschiedliche Charakteristika auf. Bisher sind in der Literatur aber nur wenige Studien verfügbar, welche diese zwei Immunoassays direkt miteinander vergleichen [74]. Der T- SPOT.TB™ basiert auf der ELISpot- Methodik und geht mit der Isolierung von PBMC aus dem Blut einher, während beim QFT™ drei spezielle Entnahmeröhrchen für Vollblutproben (Nullkontrolle, Röhrchen mit TBC- Antigenen und Positivkontrolle) mittels ELISA- Technologie („Enzyme-linked immunosorbent assay“)- einem der ELISpot- Methodik ähnlichem Verfahren- analysiert werden. Der T- SPOT.TB™ ist im Vergleich zum QFT™ zwar mit einem (relativ) größeren Arbeitsaufwand verbunden, weist aber auch gewisse Vorteile auf [74]. So z.B. zeigt sich in einer Studie an 270 Personen mit einer mikrobiell bestätigten pulmonalen TBC eine höhere Sensitivität des T- SPOT.TB™ (94,1%) im Vergleich zum QFT™ (83%), was vermutlich auf die Verwendung einer standardisierten Zellzahl an *isolierten PBMC* anstelle von Vollblutproben zurückzuführen sein kann. Zudem sind bei der Durchführung des QFT™ eine höhere Rate an (störenden) Hintergrundsignalen und unspezifischem $\text{IFN}\gamma$ sowie eine höhere Anzahl an unbestimmbar Testergebnissen, insbesondere bei Personen über 60 Jahren, feststellbar [74]. In Tabelle 2 sind die wichtigsten Eigenschaften des Tuberkulin- Hauttests (THT) sowie der zwei kommerziell erhältlichen Interferon γ - Release- Assays, nämlich QuantiFERON- TB Gold In- Tube- Test (QFT™, Cellestis) und T- SPOT.TB™, einander gegenüber gestellt.

Obwohl THT und IGRA adaptive Immunmechanismen gegen *M. tuberculosis* nachweisen können, ist mit diesen beiden Testverfahren eine direkte Diagnose einer latenten TBC- Infektion nicht möglich [6]. IGRA messen vorwiegend die reaktive Immunantwort der T- Effektorzellen, während THT die zellmedierte Reaktion vom verzögerten Typ- d.h. sowohl die Funktion von T- Effektorzellen als auch von Memory- T- Zellen- erfassen [70]. Weder THT noch $\text{IFN}\gamma$ - Release- Assays können zwischen einer aktiven oder latenten TBC unterscheiden, noch erlauben sie eine Aussage darüber, ob diese Infektion frisch ist oder schon länger zurückliegt [18]. Allerdings gibt es Hinweise dafür, dass THT eine sensiblere Nachweisgrenze für TBC- Infektionen, welche bereits einige Jahre zurückliegen, aufweisen, während IGRA eher dazu geeignet zu sein scheinen, frische Infektionen zu diagnostizieren [73]. Außerdem sollte stets berücksichtigt werden, dass

beide Testverfahren im Durchschnitt erst acht Wochen nach der Infektion ein positives Testergebnis zeigen [18], auch IGRA eine gewisse Anzahl an unbestimmbaren Ergebnissen- u.a. bei HIV- Infektion, Malignomen, chronischem Nierenversagen oder einer hochdosierten Therapie an Kortikosteroiden- aufweisen [6] und auch ein positiver IGRA keine konkrete Prognose hinsichtlich individuellem Risiko für den Ausbruch einer aktiven TBC zulässt. Zudem zeigen IGRA bei Kindern unter vier Jahren im Vergleich zu THT eine geringere Sensitivität, was wahrscheinlich auf eine eingeschränkte Produktion an IFN γ und somit auf die Unreife des kindlichen Immunsystems zurückzuführen ist [73].

Tabelle 2: THT, QFT™ und T- SPOT.TB™ im Vergleich [16] [18] [73] [74] [75]

	THT	QFT™	T- SPOT.TB™
<i>Testprinzip</i>	intrakutane Tuberkulininjektion	Interferon γ - Release- Assay (ELISA)	Interferon γ - Release- Assay (ELISpot)
<i>Getestete Antigene</i>	Tuberkulin PPD RT ₂₃	ESAT-6, CFP-10 und TB 7.7(p4)	ESAT-6, CFP 10
<i>Sensitivität</i>	70-76%	83-89%	94-99%
<i>Spezifität</i>	66-78%	>99%	100%
<i>Kreuzreaktion mit BCG- Impfstoff</i>	möglich	nein	nein
<i>Kreuzreaktion mit Umweltmykobakterien</i>	möglich	nein*	nein*
<i>Anzahl an Sitzungen</i>	2	1	1
<i>Zeitaufwand für die Testanalyse</i>	72 Stunden	ca. 2 Tage	ca. 2 Tage
<i>Testauswertung</i>	subjektiv	objektiv	objektiv
<i>Unterscheidung LTBI und aktive TBC</i>	nicht möglich		
<i>Latenzzeit Infektion- positives Testergebnis</i>	durschnittlich ca. 8 Wochen		
<i>Bevorzugter Anwendungsbereich</i>	Kinder < 5 Jahre	BCG- geimpfte Personen oder Personen mit wenig Compliance	
<i>Kosten</i>	niedrig	hoch	

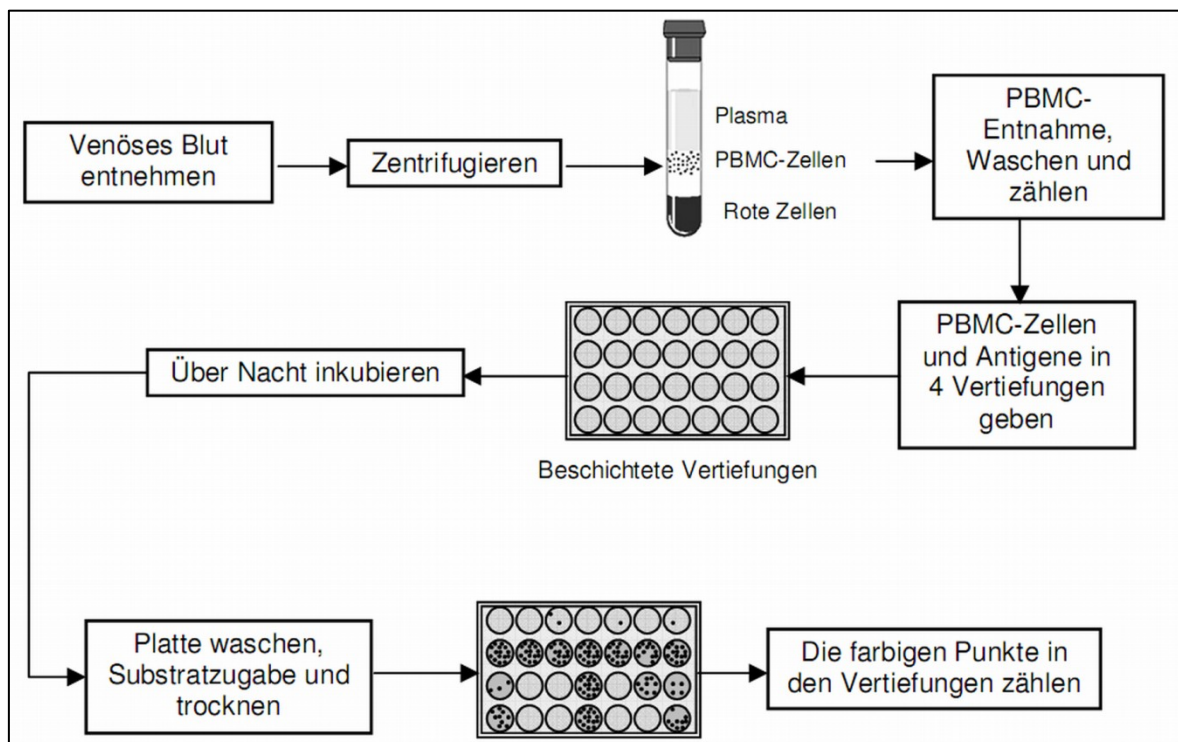
* Mit Ausnahme von *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* und *M. goodnae* verfügen die meisten Umweltmykobakterien nicht über die Antigene ESAT-6, CFP10 und TB 7.7 [16] [75].

Das primäre Ziel dieser Arbeit ist es, durch die simultane quantitative Messung der Zytokine IFN γ und IL-2 anhand eines Dual- Color- ELISpot- Assays die Aussagekraft bzw. das Anwendungsgebiet des T- SPOT.TB™ zu erweitern und somit zu einer Verbesserung der aktuell verfügbaren Methoden der TBC- Diagnostik, insbesondere hinsichtlich LTBI, beizutragen, sodass in Zukunft ein routinemäßiger Einsatz des IFN γ /IL-2- Dual- Color- ELISpot- Assays als in- vitro- Diagnostikum bzw. Screeningmethode, v.a. bei Personen mit CVID und immunsupprimierten Patienten, denkbar wäre. Anhand der Bestimmung von mono- bzw. polyfunktionellen T- Lymphozyten soll untersucht werden, ob bzw. wie sich die induzierten Zytokinprofile infolge in vitro Stimulation mit M. tuberculosis- assoziierten Antigenen bei Patienten mit einer aktiven TBC- Infektion im Vergleich zu Patienten mit einer LTBI sowie im Vergleich zu gesunden Personen unterscheiden und ob diese somit einen Rückschluss auf das jeweilige Stadium einer TBC- Erkrankung (aktive oder latente Form) erlauben. Dadurch ergäbe sich (in Zusammenschau mit anderen klinischen Befunden) die Möglichkeit, Personen mit einer aktiven TBC- Infektion zuverlässig von jenen mit einer LTBI unterscheiden und somit beiden Gruppen gezielt eine ädaquate Behandlung zukommen lassen zu können. Obwohl Personen mit LTBI weder die klinischen Symptome einer aktiven TBC zeigen noch infektiös sind, besteht ein gewisses Risiko für die Progression hin zu einer aktiven TBC- Erkrankung [73]. Daher ist es wichtig, diejenigen Risikogruppen zu identifizieren, welche von der Behandlung einer LTBI profitieren können und somit den Ausbruch einer aktiven TBC zu verhindern [73]. Als Risikofaktoren für eine Progression einer LTBI hin zu einer aktiven TBC- Infektion gelten u.a. ein supprimiertes Immunsystem (beispielsweise die Behandlung mit TNF α - Inhibitoren oder systemischen Kortikosteroiden in einer Dosierung von >15 mg Prednisone oder Äquivalent pro Tag), HIV- Infektionen, Vorschulalter, Diabetes mellitus, chronisches Nierenversagen oder eine inadäquat behandelte TBC in der Vergangenheit. Zur Zeit existiert keine Gold- Standard Methode für die Diagnostik einer LTBI [73].

Das Projekt wurde mit einem positiven Votum von Seiten der lokalen Ethikkommission genehmigt. Nach entsprechender Aufklärung sowie Unterzeichnung einer schriftlichen Einverständniserklärung (sog. „Informed consent“) durch die Studienteilnehmer erfolgten jeweils venöse Blutabnahmen, Isolierung der PBMC, Einfrieren und Poolen des gesamten Probenmaterials sowie zu einem späteren Zeitpunkt Auftauen, Bestimmung der Apoptoserate, parallele Durchführung von T- SPOT.TB™ und Dual- Color-ELISpot sowie die statistische Auswertung der erhobenen Ergebnisse. Abbildung 4 zeigt einen schematischen Überblick über den gesamten Ablauf der Analysen im Immunologie- Labor

an der Medizinischen Universität Graz, wobei- in der Graphik leider nicht ersichtlich- die PBMC nach Isolierung aus dem Blut eingefroren wurden. Zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte dann- nach vorhergehendem Auftauen und Bestimmen der Viabilität- die eigentliche Testdurchführung. Außerdem sollte beachtet werden, dass die PVDF- Platten jeweils 96 Wells besitzen, diese Tatsache der Einfachheit wegen in dieser Abbildung aber nicht berücksichtigt wurde [16].

Abbildung 4: Schematische Darstellung der wichtigsten Arbeitsschritte [16]



Folgende Daten der Studienteilnehmer wurden bei den Untersuchungen mitberücksichtigt: Alter und Geschlecht, Einnahme von immunsupprimierenden Medikamenten, TBC-Exposition (d.h. TBC- Fälle in der Familie bzw. näheren Umgebung), TBC- Erkrankung bzw. erfolgte tuberkulostatische Behandlung in der Eigenanamnese sowie die aktuelle Diagnose einer aktiven TBC- Infektion bzw. LTBI. Zudem wurden -falls vorhanden- die Befunde von THT und QFT™ (Cellestis) sowie das Vorliegen von TBC- spezifischen Symptomen, u.a. unklarer Husten, Dyspnoe, Hämoptysen, Fieber über 38°C, Nachtschweiß und Gewichtsverlust von über 10% des Körpergewichtes innerhalb von sechs Monaten (sog. „B- Symptomatik“) [18] abgeklärt. Alle personenbezogenen Daten wurden aus Datenschutzgründen in anonymisierter Form erhoben und dienen rein zu statistischen Zwecken.

3.2 Erforderliche Geräte

1. Pipettierhelfer Accu-jet® pro BRAND
2. Serologische Pipetten: 10 ml Stripette® Disposable Serological Pipette Corning Incorporated Costar®
3. Pipetten: Eppendorf Research 100-1000 µl
Eppendorf Research Plus 50 µl
Finnpipette® 20-200 µl Labsystems G13486
Finnpipette® 50-300 µl Labsystems G11143
4. Sterile Pipettenspitzen: ART® 10 REACH™ Molecular Bio Products
ART® 200 Molecular Bio Products
Finntip® 100 µl Thermo Scientific
Finntip® Thermo Scientific 1000 µl
Labsystems Finntip 300 µl Code 9401230
5. Falcon® Blue Max™ 50 ml Konische Röhrchen aus Polypropylen
6. Falcon® 14 ml Rundbodenröhrchen aus Polypropylen
7. BD Falcon™ 5ml Rundbodenröhrchen aus Polystyrol und Falcon® 5 ml Deckel für Rundbodenröhrchen
8. Transferpipetten 3,5 ml Sarstedt AG& Co, Lot 1051501
9. Cryovials® Simport, PK/100
10. Materialien zur Blutabnahme, u.a. Lithium- Heparin- Blutentnahmeröhrchen, Blutentnahmekanülen und Standardröhrchenhalter von VACUETTE®
11. CO₂ Inkubator Kendro Laboratory Products Hera cell N 40903
12. Sicherheitswerkbank Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, Typ HSP 9,1/ PE AC, Klasse II
13. Vortex Heidolph REAX top
14. Wasserbad GFL® N 40920
15. Zentrifuge Thermo Electron Corporation Labofuge 400R
16. Carl Roth Entsorgungsbeutel 200x300 mm
17. Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II
18. Einfriergerät Nalgene® Mr. Frosty™ Cryo 1°C Freezing Container
19. Tiefkühlschrank Forma Scientific Bio- Freezer, N 270895
20. Automatisiertes Zählverfahren Coulter HmX, Hematology Analyzer Beckman Coulter
21. ELISpot- Reader (C.T.L. Analyzer N 64554) und entsprechende Software (C.T.L. ImmunoSpot®)

3.3 Erforderliche Reagenzien

1. T- SPOT.TB™- Kit (Oxford Immunotec), bestehend aus [16]:
 - Mikrotiterplatte, mit murinen monoklonalen Antikörpern gegen IFN γ beschichtet
 - Panel A: ESAT-6-Antigene, Rinderserumalbumin, antimikrobielle Wirkstoffe, 2x 0,8 ml
 - Panel B: CFP10-Antigene, Rinderserumalbumin, antimikrobielle Wirkstoffe, 2x 0,8ml
 - Positivkontrolle: PHA, Rinderserumalbumin, antimikrobielle Wirkstoffe, 2x 0,8 ml
 - Konjugatreagenz: Mit AP konjugierter, muriner monoklonaler IFN γ - Antikörper, 200fach konzentriert, 50 μ l
 - BCIP/NBT^{plus} à 25 ml
2. IFN γ / IL-2 Dual- Color- ELISpot- Kit (R&D Systems), bestehend aus [17]:
 - PVDF- Mikrotiterplatte, mit spezifischen mono- bzw. polyklonalen Antikörpern gegen humanes IFN γ bzw. humanes IL-2 beschichtet
 - Detektionsantikörper- Konzentrat A : Biotinlierter polyklonaler Antikörper gegen IFN γ , 120fach konzentriert, 150 μ l
 - Detektionsantikörper- Konzentrat B: Mit HRP- konjugierter, polyklonaler Antikörper gegen IL-2; 60fach konzentriert, 250 μ l
 - Streptavidin AP- Konzentrat A, 120fach konzentriert, 150 μ l
 - Verdünnungspuffer 1 und 2, jeweils 12 ml
 - Waschpuffer- Konzentrat, 10fach konzentriert, 50 ml
 - BCIP/NBT- Chromogen, 12 ml
 - Rekombinante humane lyophilisierte Antikörper gegen IFN γ und IL-2, je 2 ng
 - 2% AEC- Chromogen, 300 μ l
 - Verdünnungspuffer für AEC- Chromogen, d.h. 0,1% H₂O₂ in Acetatpuffer à 12 ml
3. Sigma® Histopaque®- 1077, steril gefiltert, Lot RNBB8230
4. Pufferlösung PBS („Phosphate buffered saline“), GIBCO®, pH 7,4; frei an Magnesium- und Kalziumchlorid, 10010
5. Steriles Zellkulturmedium: AIM-V® Medium CTS™ GIBCO®
6. Steriles Zellkulturmedium: RPMI 1640, GIBCO® 31870, frei an L- Glutamin
7. Bidestilliertes Wasser: Aqua bidest. „Fresenius“
8. C.T.L. Cellular Technology Ltd. CTL- Wash supplement, Katalognummer CTLW-010
9. C.T.L. Cellular Technology Ltd. CTL- Cryo ABC, Katalognummer CTLC-ABC
10. BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, Katalognummer 556547
11. 1% L- Glutamin
12. C.T.L.- Anti- Aggregate™ Wash Supplement 20x (1 ml) und C.T.L. Test™ Medium

3.4 Allgemeine Vorbereitungen

3.4.1 Probengewinnung, Zellisolierung und Einfrieren

Die erforderlichen Vorbereitungen zur Durchführung des T- SPOT.TB™ sowie des IFN γ /IL-2- Dual-Color-ELISpot laufen ident ab und stützen sich auf die Vorgaben der Herstellerfirmen Oxford Immunotec [16] bzw. R&D Systems [17]. Die dafür benötigten Materialien und Geräte sind auf den vorhergehenden Seiten aufgelistet.

Zu Beginn wird den zehn Studienteilnehmern venöses Blut abgenommen, wobei zur Blutentnahme pro Proband und pro Immunoassay ein 6 ml Lithium- Heparin- Blutentnahmeröhrchen erforderlich ist und die Proben laut Herstellerangaben binnen acht Stunden verarbeitet werden sollen [16]. Bei immunsupprimierten Patienten können auch mehrere Blutentnahmeröhrchen verwendet werden, um das Vorliegen einer ausreichenden Anzahl an Zellen zu gewährleisten, zumal eine von der vorgeschriebenen Zellzahl abweichende Menge die Auswertung der Ergebnisse stark verfälschen kann [16].

Alle anschließenden Schritte zur Verarbeitung der gewonnenen Blutproben erfolgen an der sterilen Werkbank. Zuerst werden die PBMC durch das Medium Sigma® Histopaque® aus dem Blut isoliert und gewaschen, um die Entstehung von störenden Hintergrundsignalen zu verhindern sowie eventuell vorhandene extrazelluläre Zytokine zu entfernen [16] [17]. Danach werden die Proben der Studienteilnehmer tiefgefroren, um eine weitere Verwendung derselben zu einem späteren Zeitpunkt gewährleisten zu können. Tabelle 3 soll die genaue Vorgehensweise der einzelnen Arbeitsschritte erläutern.

Tabelle 3: Allgemeine Vorbereitungen zur Durchführung eines ELISpot- Assays [76]

1) Venöse Blutabnahme
<ul style="list-style-type: none">• Pro Assay jeweils ein 6 ml Lithium- Heparin- Röhrchen verwenden; evtl. auch mehr Entnahmeröhrchen bei immunsupprimierten Personen
2) Isolierung der PBMC
<ul style="list-style-type: none">• Eine sterile Handhabung ist hier von entscheidender Bedeutung• Heparinisierte Blutproben 1:2 mit PBS verdünnen• 25-30 ml verdünntes Blut über 15 ml Sigma® Histopaque® überschichten• Zentrifugieren bei 740 g (1900 Umdrehungen/min) für 30 min, <i>ohne</i> Bremse• PBMC abheben in 2 Falcons® zu je 50 ml und mit PBS bis zu 30 ml auffüllen• Für 10 min bei 330g (1300 U/min) zentrifugieren, <i>mit</i> Bremse

Tabelle 3 (Fortsetzung) [76]

3) Einfrieren der Zellen
<ul style="list-style-type: none">• CTL- Wash™ mit RPMI 1+9 auf insgesamt 10 ml verdünnen• Überstand abgießen, Zellen aufschütteln, 5 ml des verdünnten CTL- Wash™ pro Falcon resuspendieren und anschließend Zellen eines Probanden poolen• Die Zellzahl mittels automatisiertem Zählverfahren bestimmen (erwarteter Wert: 1-2 Millionen PBMC pro ml)• Bei 330 g (1300 U/min) für 10 min <i>mit</i> Bremse zentrifugieren• CTL- Cryo ABC Kit™ verwenden• Berechnung: Die Zellkonzentration mit CTL- Cryo C auf 20 Millionen Zellen pro ml einstellen• CTL- Cryo AB herstellen: CTL- Cryo A und CTL- Cryo B im Verhältnis 4+1 mischen; dieselbe Menge davon wie für Cryo- C verwenden• Nach dem Waschen Überstand abgießen; PBMC mit CTL- Cryo C auf 20 Millionen Zellen pro ml resuspendieren• Im Zeitraum von ca. 2 min langsam dasselbe Volumen an CTL- Cryo AB hinzugeben, dazwischen gut mischen• PBMC- Suspension in beschriftete Cryovials geben (1 ml pro Cryovial), dann in das Einfriergerät (sog. „Mr. Frosty™“) platzieren und für mind. 12 Stunden in den -80°C Freezer stellen. Anschließend evtl. in flüssigen Stickstoff überführen.

3.4.2 Auftauen der eingefrorenen Zellen

Nachdem die Proben aller Studienteilnehmer unabhängig voneinander an unterschiedlichen Tagen gesammelt und daher zur weiteren Verwendung tiefgefroren worden sind, erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt das Auftauen der PBMC und die Bestimmung der Viabilität (d.h. der Anzahl an lebenden Zellen mittels Durchflusszytometrie) aller Proben parallel. Das Auftauen der eingefrorenen PBMC mithilfe C.T.L.- Anti- Aggregate™ Wash Supplement sollte gemäß Angaben der Herstellerfirma C.T.L. Cellular Technology Ltd. [76] unbedingt graduell und somit schonend erfolgen, um osmotischen Stress bzw. Scherkräfte zu vermeiden und somit ein optimales Testergebnis erzielen zu können. In Tabelle 4 sind die einzelnen Arbeitsschritte zum Auftauen der PBMC, basierend auf den Angaben der Herstellerfirma Cellular Technology Ltd [76], zusammengefasst.

Tabelle 4: Auftauen der PBMC mit C.T.L.- Anti- Aggregate™ Wash Supplement [76]

1) Herstellen der benötigten Lösungen fürs Auftauen
<ul style="list-style-type: none">• Pro Cryovial je 1 Fläschchen CTL- Anti- Aggregate- Wash™ Supplement in 37°C warmen Wasserbad auftauen und 1:20 mit RPMI- 1640 verdünnen• CTL- Test™ Medium unmittelbar vor der Verwendung mit 1% frischem L- Glutamin versetzen (aufgrund der Instabilität von CTL- Test™ Medium bei 4°C)
2) Graduelles Auftauen
<ul style="list-style-type: none">• Die Temperatur der Cryovials rasch auf 37°C erhöhen (angewärmte Luft oder warmes Wasserbad) und die PBMC von insgesamt bis zu maximal 4 Cryovials in ein 50 ml konisches Röhrchen überführen• In jedes Cryovial vorsichtig tröpfchenweise 1 ml 37°C warme Auftaulösung geben• Langsam (über 1 Minute lang) 37°C warme Auftaulösung hinzufügen und das originale Volumen ca. vierfach verdünnen• Dann erneut dasselbe Volumen an warmer Auftaulösung in einem Zeitraum von ca. 30 Sekunden hinzugeben• 10 Minuten bei Raumtemperatur und 330g mit Bremse zentrifugieren• Überstand abgießen und pro Cryovial 10 ml 37°C warme Auftaulösung hinzugeben• Zellzahl mit einem automatisiertem Zählverfahren bestimmen• Die aufgetauten Proben im Inkubator belassen und unmittelbar vor dem Einsetzen in die PVDF- Platte für 10 Minuten bei 330g (Raumtemperatur, mit Bremse) zentrifugieren. Danach Überstand abgießen und die optimale Zellkonzentration mit 37°C warmen, mit 1% L- Glutamin versetzten CTL-Test™ Medium einstellen.

3.4.3 Bestimmung der Viabilität

Nach dem vorsichtigen Auftauen der PBMC werden die Zellen mit Annexin und 7- AAD (7- Amino- Actinomycin D) aus dem Annexin V Apoptosis Detection Kit I der Firma BD Pharmingen™, angefärbt, um den Prozentanteil an lebenden Zellen zu bestimmen. In Tabelle 5 sind die erforderlichen Einzelschritte zur Bestimmung der Viabilität der PBMC, aufbauend auf dem sog. „BD Phamingen™ Technical Data Sheet“ [77], angeführt.

Tabelle 5: Bestimmung der Viabilität mittels Apoptose- Assay [77]

1) PBMC zwei Mal mit 3 ml eiskaltem PBS waschen und fünf Minuten bei 1500 Umdrehungen zentrifugieren
2) Herstellen der „Binding buffer working solution“: 100 µl Binding buffer mit 900 µl destilliertes Wasser mischen und auf Eis legen
3) Gewaschene Zellen mit der hergestellten Binding buffer solution versetzen; wobei die Zellanzahl auf 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt werden soll
4) Je 5 µl Annexin und 7-AAD zu 100 µl der Zellsuspension hinzufügen und 15 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubieren
5) 400 µl Binding buffer w.s. hinzupipettieren, fünf Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren und die Apoptoserate innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer bestimmen.

3.5 T- SPOT.TB™

An dieser Stelle sollen die einzelnen Arbeitsschritte zur Durchführung des T- SPOT.TB™, basierend auf den Vorgaben des Herstellers Oxford Immunotec [16], dargestellt werden. Aufbauend auf den vorher angeführten Vorbereitungen (Kapitel 3.4 „Allgemeine Vorbereitungen“ auf Seite 64f.) erfolgt zur Stimulation der T- Zellen die Inkubation der PBMC mit den Antigenen in den Wells der Antikörper- beschichteten Mikrotiterplatte sowie in weiter Folge der Zusatz eines zweiten, enzymgekoppelten Antikörpers und eines adäquaten Substrates. Ungebundene bzw. überflüssige Reagenzien werden jeweils zwischen den einzelnen Arbeitsschritten durch Waschen entfernt. Pro Proband werden vier Wells angelegt, wobei das sterile Zellkulturmedium AIM-V® als Negativkontrolle bzw. Nullwert, also zum Nachweis einer unspezifischen Zellaktivierung und der polyklonale T- Zellaktivator Phytohämagglutinin (PHA) als Positivkontrolle, d.h. zur Bestätigung der Funktionalität der PBMC, verwendet werden. Die spezifischen Antigene ESAT-6 („Early secretory antigenic target 6“) und CFP 10 („Culture filtrate protein 10“), also Panel A und Panel B, stellen ausgewählte Antigene für den M. tuberculosis- Komplex (M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti, M. canetti) dar und dienen zur in vitro Stimulation der T- Effektorzellen, wobei eine Kreuzreaktivität mit dem BCG- Impfstoff sowie mit anderen Mykobakterien so gut wie ausgeschlossen ist [16].

Die im T- SPOT.TB™- Kit enthaltenen Materialien (Mikrotiterplatte, Panel A, Panel B, PHA und Substratlösung BCIP/NBT^{plus12}) sind bis auf das sog. „Konjugatreagenz“, also bis auf den mit AP konjugierten Detektions-Antikörper, gebrauchsfertig. Letzterer soll unmittelbar vor der Verwendung im Verhältnis 1:200 verdünnt werden. Außerdem sollen die PVDF- Platte und die Substratlösung vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht sowie AIM-V® auf 37°C vorgewärmt werden. Die anhand des T- SPOT.TB™ generierten, unlöslichen Niederschläge (Spots) als Ausdruck einer jeweils einzelnen IFN γ -produzierenden Zelle werden abschließend mit Hilfe eines automatisierten ELISpot-Readers ausgewertet, wobei die Anzahl der Spots (und somit ein „positives“ Ergebnis) direkt mit der Menge der vorhandenen sensitiven T- Effektorzellen gegen M. tuberculosis korreliert. Folglich ist das Testergebnis „negativ“, wenn in der Probe keine reaktiven T- Effektorzellen gegen M. tuberculosis nachweisbar sind. Allerdings kann trotz Vorliegen eines negativen Ergebnisses eine TBC- Infektion nicht völlig ausgeschlossen werden [16]. Tabelle 6 gibt einen Überblick über den technischen Ablauf des T-SPOT.TB™.

¹² Die Abkürzung BCIP/NBT steht für „5-Bromo-4-Chloro-3’Indolylphosphatase p- Toluidine salt (BCIP) bzw. Nitro Blue Tetrazolium Chloride“(NBT) [17].

Tabelle 6: Praktische Durchführung des T- SPOT.TB™ [16]

1) Präparieren der PVDF- Platte
<ul style="list-style-type: none">• Pro Proband werden vier Wells angelegt: Je 50 µl AIM-V® (Negativkontrolle), Panel A (ESAT-6), Panel B (CFP 10) und PHA (Positivkontrolle) für jede Probe• 100 µl (250.000 Zellen) in jedes der 4 Wells eines Probanden geben• Inkubation bei 37°C (± 1°C) mit 5% CO₂ (± 1%) für 16-20 Stunden
2) Spotentwicklung
<ul style="list-style-type: none">• PVDF- Platte aus dem Inkubator nehmen und den Überstand abgießen• Jedes Well insgesamt vier Mal mit 200 µl PBS waschen• Das konzentrierte Konjugat 1:200 mit PBS verdünnen (d.h. für zwei Proben bzw. 8 Wells 2,5 µl Konjugatreagenz zu 497,5 µl PBS hinzugeben)• 50 µl verdünntes Konjugat in jedes Well geben• Bei 2-8°C eine Stunde lang inkubieren• Konjugat abgießen und erneut jedes Well vier Mal mit je 200 µl PBS waschen• 50 µl Substratlösung in jedes Well hinzugeben und sieben Minuten bei Raumtemperatur inkubieren• Die PVDF- Platte mit destilliertem Wasser waschen, um die Reaktion zu stoppen• Die PVDF- Platte auf einer absorbierenden Unterlage ausklopfen und sorgfältig trocknen lassen (mindestens 16 Stunden in einem gut durchlüfteten Bereich oder in einem Trockenschrank bei bis zu 37°C für 4 Stunden)
3) Ergebnisinterpretation
<ul style="list-style-type: none">• Die Positivkontrolle zeigt normalerweise ≥ 20 Spots oder eine Sättigung (zu viele Spots zum Zählen), die Negativkontrolle wenige bis keine Spots• Ein <i>positives Ergebnis</i> liegt vor, wenn die Differenz aus (Panel A minus Nullwert) und / oder (Panel B minus Nullwert) ≥ 6 Spots ergibt• Ein <i>negatives Ergebnis</i> liegt vor, wenn die Differenz aus (Panel A minus Nullwert) und (Panel B minus Nullwert) ≤ 5 Spots ergibt• Das Ergebnis ist „<i>unbestimmbar</i>“, wenn die Positivkontrolle < 20 Spots zeigt. Wenn allerdings Panel A oder B positiv sind, so ist das Ergebnis „<i>valide</i>“.• Der Test ist „<i>unbestimmbar</i>“ und muss folglich wiederholt werden, wenn die Negativkontrolle > 10 Spots aufweist

3.6 Dual- Color- ELISpot

Die Vorbereitungen zur Durchführung des IFN γ /IL-2- Dual- Color- ELISpot sind auf Seite 64f. angeführt. Die darauffolgenden Arbeitsschritte stützen sich weitgehend auf die Angaben der Herstellerfirma R&D Systems [17]; allerdings wurden gewisse Änderungen des ursprünglichen Testverfahrens vorgenommen, um einen möglichst reproduzierbaren Vergleich zum parallel dazu durchgeführten T-SPOT.TB™ zu ermöglichen.

Die Kit- Komponenten des IFN γ / IL-2- Dual- Color- ELISpot sollen vor Gebrauch- bis auf die beiden Detektionsantikörper- Konzentrate sowie den Verdünnungspuffer 1 („Dilution buffer 1“)- auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Antikörper- beschichtete Mikrotiterplatte und das BCIP/NBT- Substrat liegen gebrauchsfertig vor, während die anderen Reagenzien (Waschpuffer- Konzentrat, IFN γ - und IL-2- Detektionsantikörper, AEC- Chromogen¹³, Streptavidin- AP- Konzentrat A und die rekombinanten Antikörper gegen IFN γ - und IL-2) vor Testbeginn jeweils mit einer entsprechenden Lösung verdünnt werden müssen [17]. Um einen adäquaten Referenzbereich für eine möglichst ideale Zellkonzentration ermitteln und somit optimale Testresultate erzielen zu können, werden im ersten Durchgang pro Proband jeweils Triplets mit folgender Zellzahl angelegt:

- a) 200.000 PBMC,
- b) 100.000 PBMC und
- c) 50.000 PBMC.

Zusätzlich werden im ersten Testablauf zwei Wells mit einer Negativkontrolle (RPMI mit 1% L- Glutamin) sowie je ein Well mit den rekombinanten Antikörpern gegen IFN γ und IL-2 als Positivkontrollen angelegt. Im ersten Schritt erfolgt die Durchführung des Dual- Color- ELISpot *ohne* Stimulierung der PBMC mit einem adäquaten T- Zellaktivator bzw. entsprechendem Antigen; im zweiten Schritt werden analog zum T- SPOT.TB™ pro Proband vier Wells mit jeweils AIM-V® als Negativkontrolle, PHA als Positivkontrolle sowie ESAT-6 (Panel A) und CFP 10 (Panel B) als spezifische Antigene zur Stimulation der T- Zellen angelegt, wobei die Antigene Panel A und B vom T-SPOT.TB™ stammen. Nach Inkubation der Zytokin- sezernierenden Zellen mit den an die PVDF- Platte gebundenen Antikörpern gegen IL-2 und IFN γ (und im zweiten Versuch zusätzlich dazu mit den TBC- assoziierten Antigenen), werden zur Bestimmung beider Zytokine bei beiden Durchgängen der an das Enzym HRP gekoppelte IL-2- Detektionsantikörper („Detection antibody B“) bzw. in zwei aufeinanderfolgenden Schritten der IFN γ - Detektionsantikörper

¹³ Die Abkürzung AEC- Chromogen steht für „3-Amino-9-Ethyl-Carbazole“ [17].

(„Detection antibody A“) und Streptavidin- AP jeweils getrennt voneinander hinzugefügt und abschließend die Substratlösungen BCIP/NBT und AEC- Chromogen hinzugegeben. Da Streptavidin- AP nicht von vorne herein an den biotinierten IFN γ - Detektionsantikörper gekoppelt ist, sondern zur Bindung an diesen erst separat hinzugegeben wird, kommt bei der praktischen Ausführung des Dual- Color- ELISpot im Vergleich zum T- SPOT.TB™ ein zusätzlicher Inkubations- und Waschschrift hinzu [17]. Mit Hilfe eines automatisierten ELISpot- Readers und entsprechender Software werden die Spots anschließend ausgewertet und gezählt. Jeder *blau* gefärbte Spot repräsentiert eine einzelne IFN γ - produzierende Zelle, während jeder *rote* Spot für die Anwesenheit einer einzelnen IL-2 produzierenden Zelle steht. *Violette* Spots hingegen verkörpern jene Zellen, welche sowohl IFN γ als auch IL-2 sezernieren [17]. Die entsprechenden Cut- Off- Werte bzw. Referenzbereiche zur Spotauswertung und Ergebnisinterpretation sollen im Verlauf der Erhebungen anhand der Bestimmung von unspezifisch und spezifisch stimulierten T- Lymphozyten festgelegt werden (siehe unten).

In Tabelle 7 sind die einzelnen Arbeitsschritte des Dual- Color- ELISpot- Assays, aufbauend auf den Herstellerangaben der Firma R&D Systems [17], zusammengefasst.

Tabelle 7: Praktische Durchführung des Dual- Color- ELISpot [17]

1) Inkubation von PBMC, Antigenen und Coating- Antikörper
<ul style="list-style-type: none">• In jedes Well 200 µl Zellkulturmedium (RPMI 1640 GIBCO®+ Glutamin) geben und für ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren; anschließend das Zellkulturmedium abgießen• Erster Testdurchgang (ohne Antigenstimulation): Pro Proband jeweils Triplets mit folgender Zellzahl anlegen (also insgesamt neun Wells pro Proband mit je 100 µl PBMC):<ul style="list-style-type: none">- 200.000 PBMC,- 100.000 PBMC und- 50.000 PBMC.Die Positivkontrollen mit 250 µl Zellkulturmedium versetzen und in zwei Wells pipettieren; außerdem 100 µl der Negativkontrolle (RPMI + 1% Glutamin) in zwei weitere Wells pipettieren und die PVDF- Platte im 37°C Inkubator für 16- 20 Stunden inkubieren.• Zweiter Testdurchgang (mit Antigenstimulation): Pro Proband vier Wells mit je 50 µl PHA, Panel A (ESAT-6), Panel B (CFP 10) und AIM-V® anlegen. Die verwendeten Antigene stammen vom T- SPOT.TB™ (siehe dort). Anschließend 250.000 PBMC pro Well (je 100 µl) hinzugeben und die PVDF- Platte im 37°C Inkubator für 16- 20 Stunden inkubieren.
2) Zugabe der Detektionsantikörper
<ul style="list-style-type: none">• Alle folgenden Arbeitsschritte werden in beiden Durchgängen ident durchgeführt:• Die PVDF- Platte aus dem Inkubator nehmen und den Überstand abgießen• Den Waschpuffer vor der Verwendung verdünnen, d.h. 50 ml des Waschpuffer-Konzentrates mit 450 ml destilliertem Wasser mischen• Jedes Well der PVDF- Platte insgesamt 4 Mal mit 250- 300 µl des hergestellten Waschpuffers waschen• Eine Lösung aus Detektionsantikörper A+B herstellen: 100µl von dem Detektionsantikörper- Konzentrat A und 200µl von dem Konzentrat B mit dem Verdünnungspuffer 1, sog. „Dilution buffer 1“, mischen• 100µl der verdünnten Detektionsantikörper- Lösung A+B pro Well hinzugeben• Die PVDF- Platte über Nacht bei 2-8°C inkubieren

Tabelle 7 (Fortsetzung) [17]

3) Zugabe von Streptavidin- AP
<ul style="list-style-type: none">• Den Überstand abgießen und jedes Well der PVDF- Platte erneut 4 Mal mit 250-300 µl des hergestellten Waschpuffers waschen• 100µl Streptavidin- AP- Konzentrat A mit dem Verdünnungspuffer 2, sog. „Dilution buffer 2“, mischen• 100µl der verdünnten Streptavidin- AP- Lösung pro Well hinzugeben• Inkubation der PVDF- Platte für 2 Stunden bei Raumtemperatur
4) Spotentwicklung
<ul style="list-style-type: none">• Den Überstand abgießen und jedes Well der PVDF-Platte 4 Mal mit 250-300 µl des hergestellten Waschpuffers waschen• 100 µl BCIP/NBT- Chromogen zu jedem Well geben• Die Reaktion erfolgt im Dunklen bei Raumtemperatur, 1 Stunde abwarten• Überstand abgießen und die PVDF- Platte mit destilliertem Wasser waschen, um die Reaktion zu stoppen• 250 µl AEC- Chromogen mit entsprechender Verdünnungslösung (sog. „AEC- chromogen buffer“) mischen• 100 µl der hergestellten AEC- Chromogen- Lösung zu jedem Well geben• Die Reaktion erfolgt im Dunklen bei Raumtemperatur, 20 Minuten abwarten• Den Überstand verwerfen und die PVDF- Platte mit destilliertem Wasser waschen, um die Reaktion zu stoppen• Die PVDF- Platte umdrehen und die Membran vollständig trocknen lassen, entweder bei Raumtemperatur für 60 - 90 Minuten oder bei 37°C für 15 - 30 Minuten
5) Ergebnisinterpretation
<ul style="list-style-type: none">• <i>Rote Spots</i> repräsentieren das Vorhandensein von <i>IL-2</i>- sezernierenden Zellen• <i>Blaue Spots</i> spiegeln die Anwesenheit von <i>IFNγ</i>- produzierenden Zellen wieder• <i>Violette Spots</i> verkörpern Zellen, welche <i>sowohl IFNγ als auch IL-2</i> freisetzen• Die Cut- Off- Werte bzw. Referenzbereiche sollen im Verlauf der Erhebungen bestimmt werden (siehe unten).

4 Ergebnisse- Resultate

4.1 Studienpopulation

Die Selektion der Studienteilnehmer erfolgte in Zusammenarbeit mit der **klinischen Abteilung für Pulmologie** am Universitätsklinikum Graz per Zufall und ohne Geschlechtspräferenz, aber unter dem Ausschluss von Minderjährigen und Schwangeren. Alle personenbezogenen Daten wurden aus Datenschutzgründen in anonymisierter Form erhoben und ausgewertet. Aufgrund der geringen TBC- Prävalenz im Einzugsgebiet des Universitätsklinikums Graz setzt sich das untersuchte Patientenkollektiv aus sechs Personen mit einer latenten tuberkulösen Infektion (LTBI) sowie einer Person mit einer aktiven Lymphknoten- Tuberkulose (TBC) zusammen. Außerdem wurden drei gesunde Personen bzw. Negativkontrollen zur Bestätigung der Funktionalität beider Testverfahren ausgewählt. In Tabelle 8 sind die Charakteristika der Studienpopulation aufgelistet.

Tabelle 8: Charakteristika der Studienpopulation

Charakteristika	Frauen	Männer	Gesamt
<i>Probandenanzahl</i>	4	6	10
<i>Durchschnittliches Alter in Jahren</i>	44,25	43	43,5
<i>Anzahl an Personen mit immunsuppressiver (Dauer-) Therapie, davon:</i>	1	1	2
- Kortikosteroide	1	0	1
- Methotrexat	0	1	1
<i>Anzahl an Personen mit bestätigter TBC- Exposition</i>	2	0	2
<i>Anzahl an Personen mit LTBI</i>	2	4	6
<i>Anzahl an Personen mit aktiver TBC, davon</i>	0	1	1
- aktive Lymphknoten- TBC	0	1	1
<i>Anzahl an Personen mit TBC in der Eigenanamnese</i>	0	0	0
<i>Anzahl an gesunden Personen (Negativkontrollen)</i>	1	2	3
<i>Anzahl an Personen mit Migrationshintergrund</i>	1	1	2
<i>Anzahl an Personen mit positivem THT bzw. QFT™:</i>			
- THT positiv	3	2	5
- QFT™ positiv	3	3	6
- THT und QFT™ positiv	3	2	5

Tabelle 8 (Fortsetzung)

Charakteristika	Frauen	Männer	Gesamt
<i>Anzahl an Personen mit TBC- typischen Symptomen:</i>	1	2	3
- <i>Husten</i>	1	1	2
- <i>Dyspnoe</i>	0	1	1
- <i>Fieber</i>	0	0	0
- <i>Nachtschweiß</i>	0	1	1
- <i>Gewichtsverlust</i>	0	1	1
- <i>Hämoptysen</i>	0	0	0

4.2 Erster Testdurchgang

Der T- SPOT.TB™ wird parallel zum Dual- Color- ELISpot- Assay durchgeführt, wobei bei Letzterem die optimale Zellkonzentration erst im Laufe der Erhebungen ermittelt werden soll. Die mittels Annexinfärbung und Durchflusszytometrie gemessene Viabilität der Proben aller zehn Studienteilnehmer beträgt nach dem Auftauen im ersten Testdurchgang zwischen 85% und 95%. Im Anschluss sind die Ergebnisse beider Immunoassays dargestellt.

4.2.1 Spotauswertung des T- SPOT.TB™

Ein typisches Testergebnis weist weniger als zehn Spots im Nullwert (AIM-V) und mehr als zwanzig Spots in der Positivkontrolle (PHA) auf [16]. Obwohl bei allen Studienteilnehmern die Kriterien für die Positivkontrolle erfüllt sind, wird hingegen bei acht von zehn Probanden die festgelegte Obergrenze von zehn Spots in der Negativkontrolle überschritten, sodass die Testergebnisse in diesen Fällen nicht auswertbar sind. Die einzigen zwei validen Proben stammen von Personen mit LTBI. In Tabelle 9 und Tabelle 10 sowie Abbildung 5 sind die erzielten Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 9: Spotauswertung des ersten Testdurchganges des T- SPOT.TB™

Kategorie	Anzahl an Spots je Proband									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
AIM-V	42	44	183	5	6	60	87	30	172	159
Panel A	39	39	142	371	19	59	26	25	150	46
Panel B	33	35	99	151	21	31	42	30	144	83
PHA	592	646	465	521	337	587	919	689	702	521

Gesunde Personen: A, B, G

Personen mit LTBI: C, D, E, F, H, J

Person mit aktiver TBC: I

Tabelle 10: Ergebnisinterpretation des ersten Testdurchganges des T- SPOT.TB™

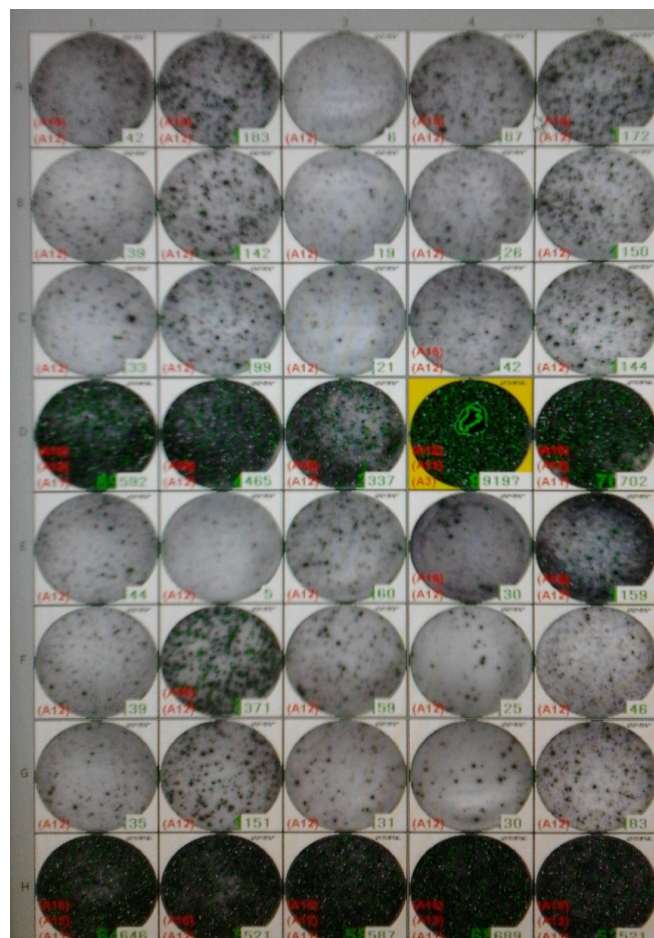
Proband	(Panel A- Nullwert) oder (Panel B- Nullwert)	(Panel A- Nullwert) und (Panel B- Nullwert)	Testresultat
A	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	Nicht auswertbar
B	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	Nicht auswertbar
C	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	Nicht auswertbar
D	366 bzw. 146 Spots	512 Spots	Positiv
E	13 bzw. 15 Spots	28 Spots	Positiv
F	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	Nicht auswertbar
G	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	Nicht auswertbar
H	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	Nicht auswertbar
I	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	Nicht auswertbar
J	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	Nicht auswertbar

Gesunde Personen: A, B, G

Personen mit LTBI: C, D, E, F, H, J

Person mit aktiver TBC: I

Abbildung 5: Überblick über die Spotauswertung des T- SPOT.TB™



4.2.2 Spotauswertung des Dual- Color- ELISpot

Im ersten Versuch wird das Dual- Color- ELISpot- Assay *ohne* Stimulation der PBMC durchgeführt. Außerdem werden zur Ermittlung der optimalen Zellkonzentration pro Proband jeweils Triplets à 50.000 PBMC, 100.000 PBMC und 200.000 PBMC pro Well angelegt. *Rote* Spots repräsentieren die Sekretion von IL-2, *blaue* Spots jene von IFN γ und *violette* Spots die simultane Sekretion sowohl von IFN γ als auch von IL-2 (Tabelle 11).

Tabelle 11: Anzahl an blauen, roten und violetten Spots pro Proband und Konzentration

Proband	Ansatz	Spotanzahl bei 200.000 PBMC/ Well:			Spotanzahl bei 100.000 PBMC/ Well:			Spotanzahl bei 50.000 PBMC/ Well:		
		blau	rot	violett	blau	rot	violett	blau	rot	violett
Proband A	1. Ansatz	72	2	0	15	3	0	1	2	0
	2. Ansatz	89	19	14	19	1	0	0	0	0
	3. Ansatz	93	11	6	16	0	0	2	0	0
Proband B	1. Ansatz	38	8	1	6	0	0	2	0	0
	2. Ansatz	32	2	0	10	1	0	3	1	0
	3. Ansatz	39	2	1	8	1	0	3	0	0
Proband C	1. Ansatz	91	6	2	71	4	1	19	4	1
	2. Ansatz	74	8	3	56	4	1	12	0	0
	3. Ansatz	86	9	3	54	13	2	15	0	0
Proband D	1. Ansatz	15	2	0	8	1	0	2	0	0
	2. Ansatz	9	0	0	5	0	0	2	0	0
	3. Ansatz	15	2	1	9	2	0	3	0	0
Proband E	1. Ansatz	22	1	0	1	0	0	1	1	0
	2. Ansatz	19	1	0	1	0	0	0	0	0
	3. Ansatz	10	1	0	4	1	0	0	0	0
Proband F	1. Ansatz	20	4	1	9	3	0	5	0	0
	2. Ansatz	25	1	0	8	2	0	8	0	0
	3. Ansatz	14	9	0	47	0	0	14	1	0
Proband G	1. Ansatz	71	8	5	22	0	0	37	1	0
	2. Ansatz	35	12	1	38	1	0	32	0	0
	3. Ansatz	54	5	2	42	5	2	21	0	0
Proband H	1. Ansatz	14	0	0	0	0	0	1	0	0
	2. Ansatz	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	3. Ansatz	8	1	0	2	0	0	0	0	0
Proband I	1. Ansatz	130	15	10	75	2	2	16	0	0
	2. Ansatz	181	16	9	86	2	2	9	2	0
	3. Ansatz	130	4	2	71	4	3	7	1	1
Proband J	1. Ansatz	30	0	0	17	0	0	1	0	0
	2. Ansatz	35	1	0	31	0	0	1	0	0
	3. Ansatz	44	2	0	15	0	0	0	0	0

Gesunde Personen: Probanden A, B, G

Personen mit LTBI: C, D, E, F, H, J

Person mit aktiver TBC: I

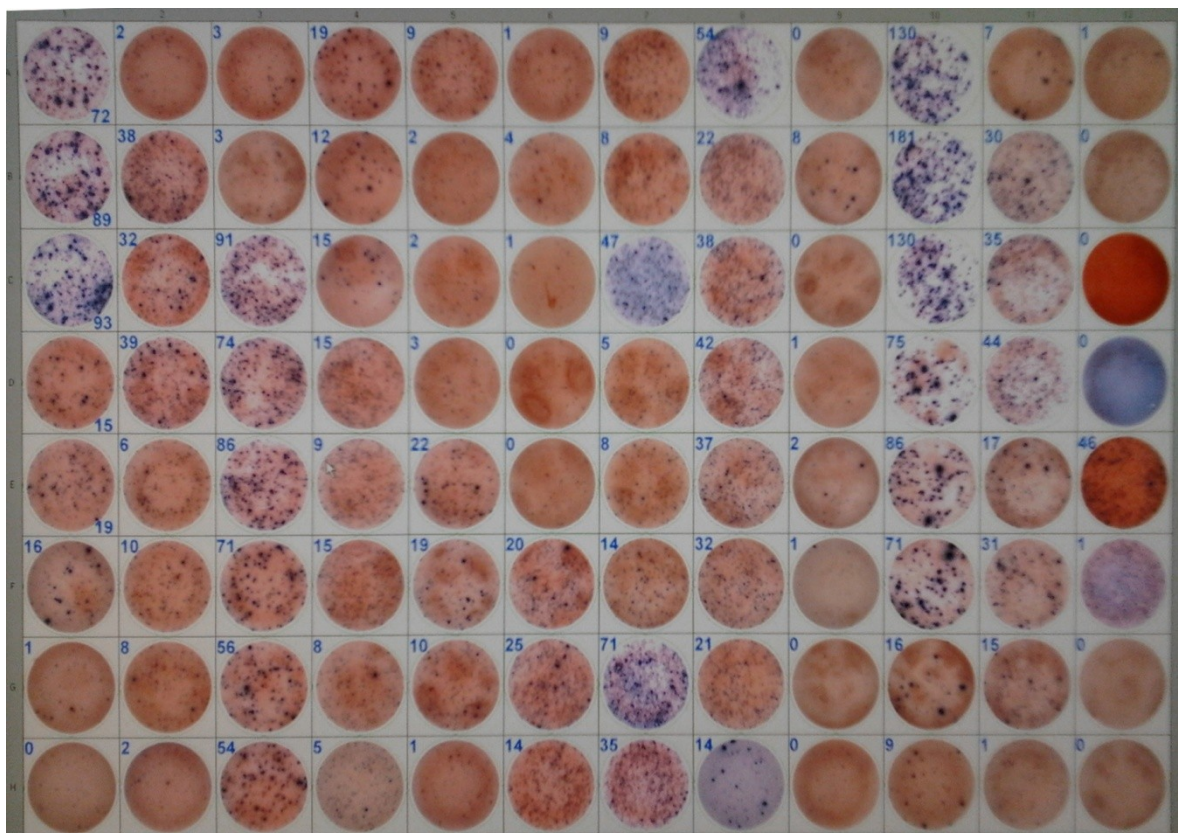
4.2.2.1 Quantitative Messung von IFN γ

Tabelle 12: Sekretion von IFN γ in Abhängigkeit vom Immunstatus

Immunstatus	Zellkonzentration <i>pro Well</i>	Anzahl an blauen Spots pro Triplet*		
		Maximum	Median	Minimum
Gesund	200.000	254	160	109
	100.000	102	50	24
	50.000	90	8	3
LTBI	200.000	251	55	22
	100.000	181	42,5	3
	50.000	46	4,5	1
Aktive TBC	200.000	441	441	441
	100.000	232	232	232
	50.000	32	32	32

* Anmerkung: Es gibt nur einen einzigen Probanden mit aktiver TBC in dieser Studienpopulation

Abbildung 6: Sekretion von IFN γ ohne Antigen- Stimulation



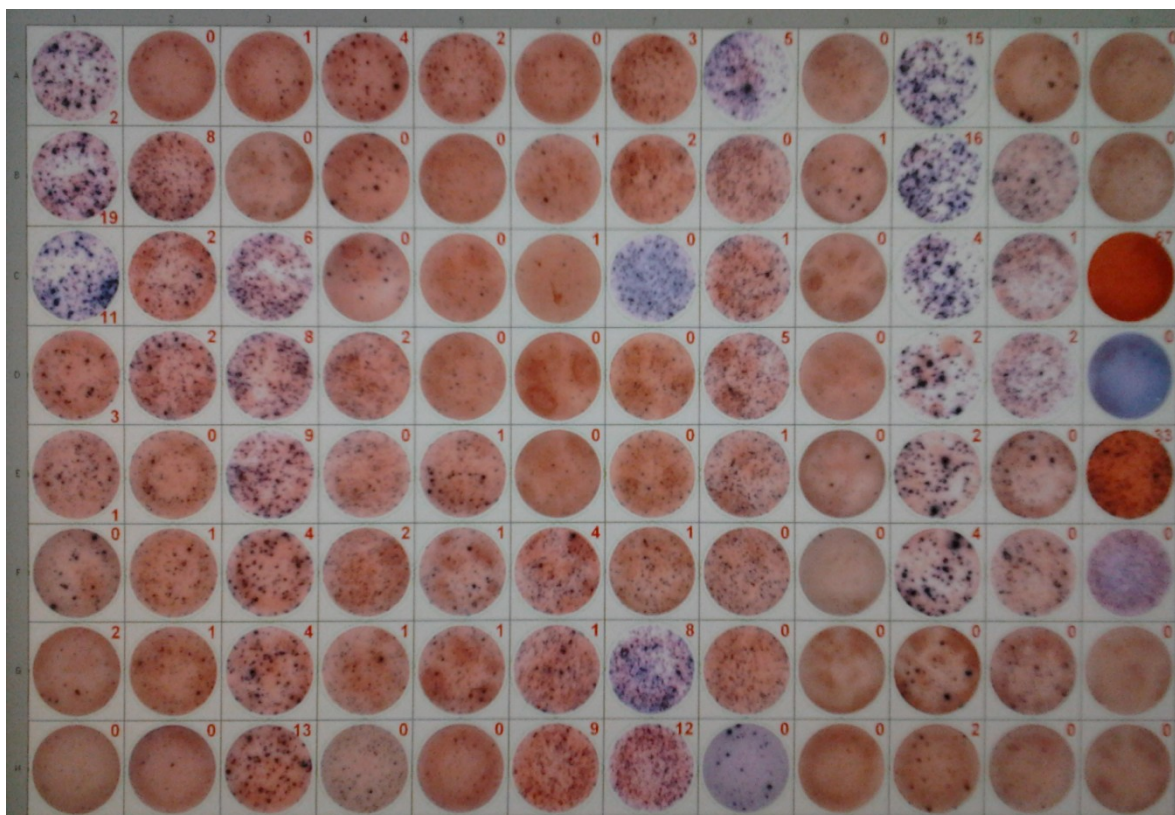
4.2.2.2 Quantitative Messung von IL-2

Tabelle 13: Sekretion von IL- 2 in Abhängigkeit vom Immunstatus

Immunstatus	Zellkonzentration <i>pro Well</i>	Anzahl an roten Spots pro Triplet*		
		Maximum	Median	Minimum
Gesund	200.000	32	25	12
	100.000	6	4	2
	50.000	2	1	1
LTBI	200.000	23	3,5	1
	100.000	21	2	0
	50.000	4	0,5	0
Aktive TBC	200.000	35	35	35
	100.000	8	8	8
	50.000	3	3	3

* Anmerkung: Es gibt nur einen einzigen Probanden mit aktiver TBC in dieser Studienpopulation

Abbildung 7: Sekretion von IL- 2 ohne Antigen- Stimulation



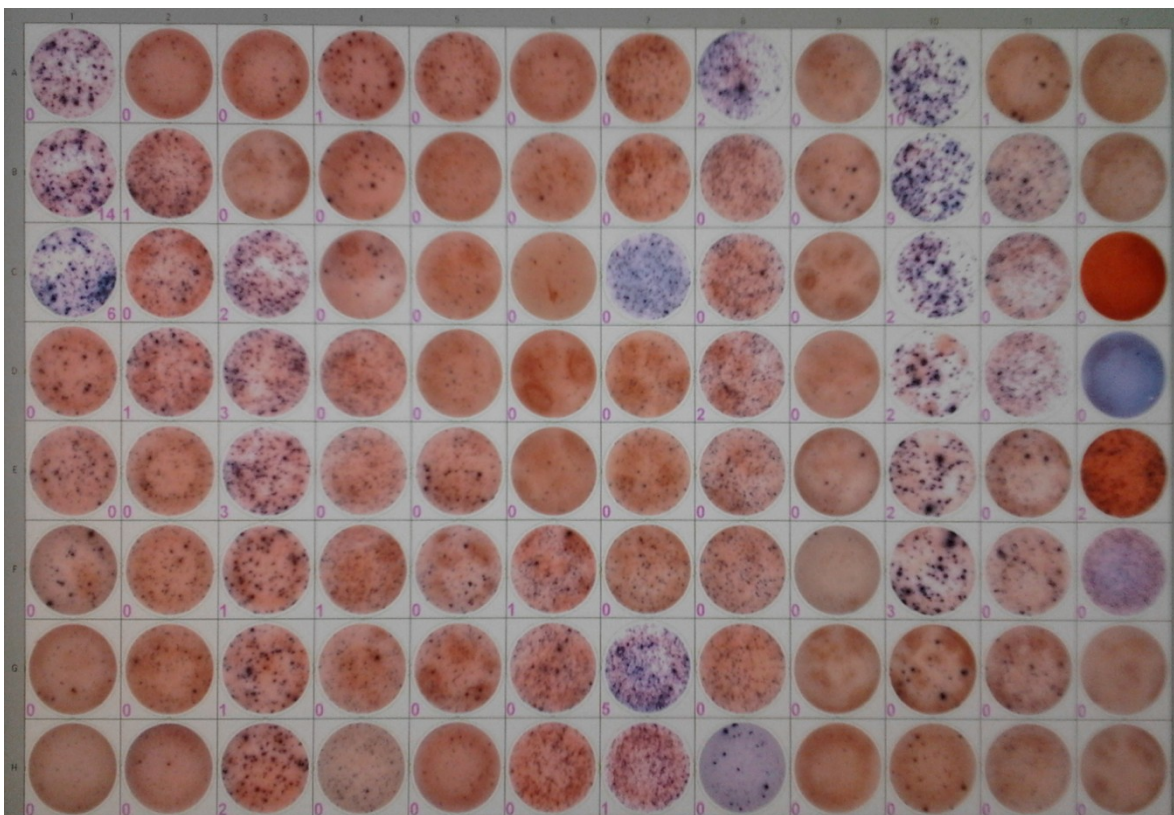
4.2.2.3 Simultane quantitative Messung von IFN γ und IL-2

Tabelle 14: Simultane Sekretion von IFN γ und IL-2 in Abhängigkeit vom Immunstatus

Immunstatus	Zellkonzentration <i>pro Well</i>	Anzahl an violetten Spots pro Triplet*		
		Maximum	Median	Minimum
Gesund	200.000	20	8	2
	100.000	2	0	0
	50.000	0	0	0
LTBI	200.000	8	0,5	0
	100.000	4	0	0
	50.000	1	0	0
Aktive TBC	200.000	21	21	21
	100.000	7	7	7
	50.000	1	1	1

* Anmerkung: Es gibt nur einen einzigen Probanden mit aktiver TBC in dieser Studienpopulation

Abbildung 8: Simultane Sekretion von IFN γ und IL-2 ohne Antigen- Stimulation



4.3 Zweiter Testdurchgang

Um die Anzahl an validen Testergebnissen zu erhöhen, wurden beide Immunoassays ein zweites Mal ausgeführt. Der T- SPOT.TB™ wurde in derselben Art und Weise wie beim Vorversuch wiederholt, während das Dual- Color- ELISpot- Assay in abgeänderter Form, d.h. anhand Stimulation der PBMC mit den TBC- spezifischen Antigenen ESAT-6 und CFP 10, durchgeführt wurde. Allerdings war die Anzahl an PBMC von Proband C für den zweiten Versuch nicht ausreichend, sodass an dessen Stelle die PBMC eines zusätzlichen, gesunden Teilnehmers (Proband C*) herangezogen wurden. Die mittels Annexinfärbung und Durchflusszytometrie bestimmte Viabilität des Probenmaterials nach dem Auftauen lag im zweiten Durchgang zwischen 74% und 88%.

4.3.1 Wiederholung des T- SPOT.TB™

Auch im zweiten Versuch wird bei der Hälfte der Studienteilnehmer eine zu hohe Spotanzahl in der Nullkontrolle ersichtlich, welche die vom Hersteller Oxford Immunotec festgelegte Obergrenze von maximal zehn Spots [16] im Nullwert (AIM-V) zum Teil deutlich überschreitet. Somit können die Testergebnisse von insgesamt fünf Probanden (drei gesunde Probanden, ein Proband mit einer latent tuberkulösen Infektion sowie der Proband mit der aktiven Lymphknoten- TBC) nicht ausgewertet werden. In beiden Testabläufen des T- SPOT.TB™ entspricht das Endergebnis des Patienten mit einer aktiven Lymphknoten- Tuberkulose nicht den Kriterien zur Ergebnisinterpretation des Herstellers; beim zweiten Testdurchgang können jedoch im Vergleich zum Vorversuch immerhin fünf statt nur zwei Testergebnisse ausgewertet werden. In Tabelle 15, Tabelle 16 sowie Abbildung 9 sind Spotauswertung und Ergebnisinterpretation des zweiten Testdurchganges des T- SPOT.TB™ angeführt.

Tabelle 15: Anzahl an Spots im zweiten Testdurchgang des T- SPOT.TB™

Kategorie	Anzahl an Spots je Proband									
	A	B	C*	D	E	F	G	H	I	J
AIM-V	12	16	0	2	4	10	51	1	282	43
Panel A	5	17	1	283	8	24	13	16	138	12
Panel B	10	5	3	20	11	14	26	4	182	65
PHA	241	368	668	583	294	307	587	626	733	540

Gesunde Personen: A, B, C*, G Personen mit LTBI: D, E, F, H, J Person mit aktiver TBC: I

Tabelle 16: Ergebnisinterpretation des zweiten Testdurchganges des T- SPOT.TB™

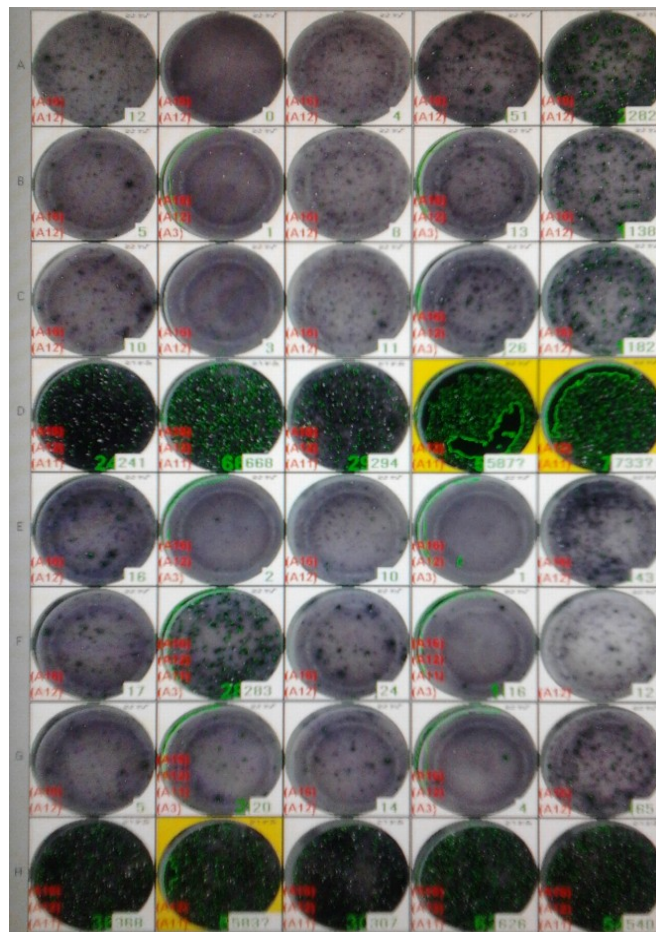
Proband	(Panel A- Nullwert) oder (Panel B- Nullwert)	(Panel A- Nullwert) und (Panel B- Nullwert)	Testresultat
A	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	Nicht auswertbar
B	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	Nicht auswertbar
C*	1 bzw. 3 Spots	4 Spots	Negativ
D	281 bzw. 18 Spots	299 Spots	Positiv
E	4 bzw. 7 Spots	11 Spots	Positiv
F	14 bzw. 10 Spots	24 Spots	Positiv
G	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	Nicht auswertbar
H	15 bzw. 3 Spots	18 Spots	Positiv
I	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	Nicht auswertbar
J	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	<i>Nullwert >10 Spots!</i>	Nicht auswertbar

Gesunde Personen: A, B, C*, G

Personen mit LTBI: D, E, F, H, J

Person mit aktiver TBC: I

Abbildung 9: Spotauswertung im zweiten Testdurchgang des T- SPOT.TB™



4.3.2 Dual- Color- ELISpot mit Antigen- Stimulation

Im zweiten Durchgang wird das Dual- Color- ELISpot- Assay analog zur Vorgangsweise des T- SPOT.TB™ durchgeführt; außerdem kommen zur Stimulierung der PBMC hier genau dieselben TBC- spezifischen Antigene, nämlich Panel A (ESAT-6) sowie Panel B (CFP 10) zum Einsatz. Negativ- und Positivkontrolle werden jeweils nur einzeln, die Wells mit den TBC- spezifischen Antigenen hingegen in Triplets angelegt und- aufbauend auf den Ergebnissen des Vorversuches- eine Zellkonzentration von 250.000 PBMC pro Patient und pro Well gewählt.

Ähnlich zum T- SPOT.TB™ fällt auch hier bereits mit freiem Auge ein große Anzahl an unspezifischen Hintergrundsignalen auf, die sich als stark rötlich gefärbter Hintergrund manifestieren. Bei näherer Betrachtung lässt sich außerdem eine inhomogene Oberfläche in den einzelnen Wells der PVDF- Platte feststellen, deren Ausprägung sehr variabel ausfällt. Ähnlich wie beim T- SPOT.TB™ zeigt auch beim Dual- Color- ELISpot- Assay die Nullkontrolle bis auf einzelne wenige Ausnahmen eine hohe Anzahl an Spots. Obwohl sich die Testinterpretation des Dual- Color- ELISpot nach Stimulation mit Mycobacterium tuberculosis- assoziierten Antigenen schwierig gestaltet, sind tendentiell dennoch einige Parallelen zum T- SPOT.TB™ erkennbar. Proband C* und Proband H zeigen sowohl beim Dual- Color- ELISpot als auch beim T- SPOT.TB™ jeweils wenige bis keine Spots im Nullwert sowie nur sehr wenige Spots in Panel A bzw. Panel B; zudem sind bei Proband D bei beiden Immunoassays in der Nullkontrolle wenige bis keine Spots, in den Wells von Panel A jedoch eine hohe Zytokinsekretion nachweisbar. Abbildung 10 und Tabelle 17 geben einen Überblick über die Spotauswertung und Ergebnisinterpretation des Dual- Color- ELISpot nach Antigen- Stimulation.

Abbildung 10: Dual- Color- ELISpot nach Stimulation mit ESAT- 6 und CFP 10

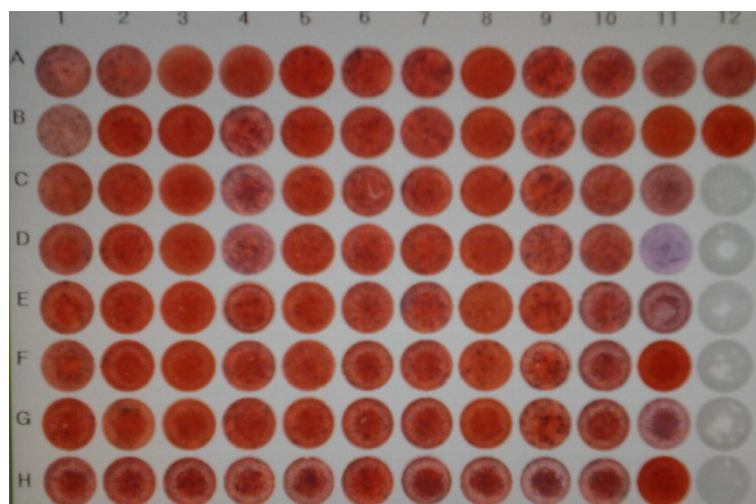


Tabelle 17: Anzahl an blauen, roten und violetten Spots nach Antigen- Stimulation

Proband	Ansatz	Spotanzahl in der Negativkontrolle:			Spotanzahl in Panel A:			Spotanzahl in Panel B:			Spotanzahl in der Positivkontrolle:		
		blau	rot	violett	blau	rot	violett	blau	rot	violett	blau	rot	violett
Proband A	1. Ansatz	2	1	0	2	1	1	0	15	0	0	3	0
	2. Ansatz				0	2	0	0	1	0			
	3. Ansatz				1	6	0	2	22	0			
Proband B	1. Ansatz	1	1	0	1	28	0	2	18	0	0	19	0
	2. Ansatz				0	10	0	0	16	0			
	3. Ansatz				1	19	1	2	7	0			
Proband C*	1. Ansatz	0	0	0	0	17	0	0	11	0	0	53	0
	2. Ansatz				0	0	0	0	21	0			
	3. Ansatz				0	0	0	0	22	0			
Proband D	1. Ansatz	0	0	0	6	18	0	3	70	0	0	73	0
	2. Ansatz				1	3	0	2	31	0			
	3. Ansatz				1	0	0	0	60	0			
Proband E	1. Ansatz	3	11	1	1	35	0	1	8	0	0	63	0
	2. Ansatz				1	30	0	0	0	0			
	3. Ansatz				0	1	0	0	28	0			
Proband F	1. Ansatz	2	45	1	0	6	0	0	0	0	0	50	0
	2. Ansatz				0	55	0	0	53	0			
	3. Ansatz				0	0	0	2	56	0			
Proband G	1. Ansatz	0	93	0	0	7	0	0	4	0	0	72	0
	2. Ansatz				0	61	0	0	6	0			
	3. Ansatz				0	4	0	0	57	0			
Proband H	1. Ansatz	0	29	0	0	38	0	1	2	1	0	48	0
	2. Ansatz				0	34	0	5	2	0			
	3. Ansatz				1	33	0	0	32	0			
Proband I	1. Ansatz	20	29	0	6	11	1	8	13	0	0	39	0
	2. Ansatz				9	34	0	10	50	1			
	3. Ansatz				6	3	0	15	27	1			
Proband J	1. Ansatz	0	38	0	0	1	0	1	8	0	0	33	0
	2. Ansatz				0	1	0	0	4	0			
	3. Ansatz				0	2	0	2	29	0			

Legende: Gesunde Personen= Probanden A,B, C*, G

Personen mit LTBI= Probanden D, E, F, H, J

Person mit aktiver TBC= Proband I

Blaue Spots: IFN γ - Produktion

Rote Spots: IL-2- Produktion

Violette Spots: Produktion von IFN γ und IL-2

5 Diskussion

Das Hauptziel dieser Arbeit besteht darin, durch die simultane quantitative Messung der Zytokine IFN γ und IL-2 anhand eines Dual- Color- ELISpot- Assays und der sich daraus ergebenden Möglichkeit, zwischen Primärantwort (Stimulation von naiven T-Zellen) und Sekundärantwort (Stimulation von Memory- T- Zellen) der zellmedierten, erworbenen Immunität unterscheiden sowie Rückschlüsse auf die jeweilige Krankheitsaktivität ziehen zu können, die Aussagekraft bzw. das Anwendungsgebiet von traditionellen Single- Color- ELISpot- Assays, welche die Sekretion eines einzelnen Zytokins nachweisen, zu erweitern. Anhand der Bestimmung von mono- bzw. polyfunktionellen T- Lymphozyten wurde untersucht, ob bzw. wie sich die induzierten Zytokinprofile bei Patienten mit einer aktiven TBC- Infektion im Vergleich zu Patienten mit einer LTBI sowie im Vergleich zu gesunden Personen unterscheiden und ob diese somit einen Rückschluss auf das jeweilige Stadium einer TBC- Erkrankung (aktive oder latente Form) erlauben. Zu diesem Zweck wurde die zellmedierte spezifische Immunantwort von insgesamt zehn Personen- drei gesunde Probanden, sechs Personen mit einer latenten tuberkulösen Infektion (LTBI) und ein Patient mit einer aktiven Lymphknoten- Tuberkulose (TBC)- jeweils separat sowohl mittels T- SPOT.TB™ (Oxford Immunotec)- einer vereinfachten Variante der Single- Color- ELISpot- Methodik zum Nachweis von IFN γ [16]- als auch anhand Dual- Color- ELISpot (R&D Systems) zur simultanen quantitativen Messung von IFN γ und IL-2 [17] untersucht. Selbstverständlich können die Ergebnisse der beiden angeführten Immunoassays nur unter Berücksichtigung der klinischen Symptomatik, des individuellen Erkrankungsrisikos sowie weiterführender medizinischer bzw. diagnostischer Untersuchungen der jeweiligen Person interpretiert werden.

Im **ersten Testdurchgang** konnten lediglich zwei von zehn Testergebnissen des *T- SPOT.TB™* ausgewertet werden, da die Negativkontrolle in acht von zehn Fällen zu viele Spots aufweist. Die vom Hersteller Oxford Immunotec festgelegte obere Grenze von zehn Spots im Nullwert [16] wurde selbst bei gesunden Kontrollpersonen bei Weitem überschritten; mit freiem Auge betrachtet unterscheidet sich der Nullwert hinsichtlich Spotanzahl mitunter nur geringfügig von der Positivkontrolle; sodass der Test von diesen Personen gemäß Evaluationskriterien des Herstellers wiederholt werden muss. Diese erhöhte Anzahl an unspezifischen Hintergrundsignalen könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass die Blutproben ursprünglich eingefroren und unmittelbar vor der Testdurchführung wieder aufgetaut worden sind. Obwohl Einfrieren und Auftauen der PBMC schonend vollzogen wurden und die Viabilität des Probenmaterials nach dem

Auftauen zwischen 85% und 95% betrug, könnte dieser Vorgang zu einer unspezifischen, aber nicht unerheblichen Zytokinsekretion geführt haben und somit die Testauswertung beeinträchtigen. Die zugrundeliegenden Ursachen bzw. Mechanismen hierfür sind unklar. In der Literatur finden sich nämlich Hinweise dafür, dass eine Kryopräservierung der PBMC verglichen mit frisch isoliertem Probenmaterial keine negativen Auswirkungen auf das Ausmaß der Immunantwort der Antigen-spezifischen CD4- und CD8- Zellen in ELISpot-Assays ausübt, sodass diese Annahme eher zu vernachlässigen ist [78]. Jene zwei Proben, die als einzige von insgesamt zehn Studienteilnehmern den Testkriterien des Herstellers Oxford Immunotec entsprechen- d.h. jeweils <10 Spots im Nullwert sowie >20 Spots in der Positivkontrolle aufweisen [16]- stammen von zwei Personen mit LTBI. Die Differenz aus (Panel A- Nullwert) einerseits ergibt 13 bzw. 366 Spots und die Differenz aus (Panel B- Nullwert) andererseits 15 bzw. 146 Spots, sodass aufbauend auf den Evaluierungskriterien des Herstellers bei einer Auswertung von ≥ 6 Spots jeweils ein positives Testergebnis resultiert [16].

Bei der Auswertung des *Dual- Color- ELISpot* zeigt sich im ersten Testdurchgang, dass auch ohne (Vor-) Stimulierung der PBMC mit einem entsprechendem T- Zellaktivator bzw. Antigen bereits eine gewisse Zytokinsekretion nachweisbar ist, wobei diese von der jeweiligen Zellkonzentration abhängt. Eine Anzahl an 200.000 Zellen pro Well hat unter den drei ausgewählten Zellkonzentrationen in dieser Arbeit (200.000/100.000/50.000 PBMC pro Well) die weitaus höchste Zytokinproduktion zur Folge; diese nimmt bei Verwendung von 100.000 Zellen pro Well sukzessiv ab und ist bei einer Anzahl an 50.000 Zellen pro Well schließlich nicht mehr aussagekräftig. Dies ist ein erster Hinweis dafür, dass die erforderliche untere Grenze für eine möglichst optimale Zellkonzentration des *Dual- Color- ELISpot* bei ca. 200.000 Zellen pro Well angesiedelt ist- wobei unklar ist, in welchem Bereich die obere bzw. maximale Grenze der erforderlichen Zellzahl hierfür liegt. Generell fällt unter Verwendung von unstimulierten PBMC eine IFN γ - dominante Immunantwort auf, während monofunktionelle, ausschließlich IL-2 produzierende Zellen sowie polyfunktionelle Zellen, welche simultan sowohl IL-2 als auch IFN γ freisetzen, nur in geringer Anzahl vorhanden sind. Außerdem wurde bei der Auswertung der Spots festgestellt, dass der Studienteilnehmer mit einer aktiven Lymphknoten- TBC bei Verwendung von unstimulierten T- Lymphozyten sowohl im Vergleich zu den Personen mit LTBI, als auch zu den gesunden Negativkontrollen tendentiell die höchste Zytokinproduktion, unabhängig von der Zellkonzentration, aufweist. Sowohl die Anzahl an monofunktionellen T- Lymphozyten, die entweder IFN γ oder IL-2 sezernieren, als auch

die Anzahl an polyfunktionellen T- Lymphozyten, die beide Zytokine gleichzeitig freisetzen, scheinen bei einer aktiven TBC- Infektion im Vergleich zu Personen mit LTBI und zur gesunden Normalbevölkerung deutlich erhöht zu sein. Personen mit LTBI weisen im Gegensatz dazu im Durchschnitt die geringste Stimulation der T- Lymphozyten auf, während gesunde Kontrollpersonen sich in Bezug auf die Zytokinsekretion vorwiegend im mittleren Bereich anordnen.

Im **zweiten Testdurchlauf** kann im Gegensatz zum ersten Versuch zwar immerhin die Hälfte der Ergebnisse des *T- SPOT.TB™* ausgewertet werden, dennoch ist auch hier im Nullwert generell eine hohe Anzahl an unspezifischen Hintergrundsignalen festzustellen, welche die Testauswertung in der Hälfte der Fälle unmöglich macht. Bei fünf von zehn Proben, die laut Herstellerangaben den Kriterien zur Testauswertung entsprechen, handelt es sich um vier Personen mit LTBI sowie um jenen gesunden Probanden (Proband C*), welcher erst im zweiten Testdurchgang- anstelle von Proband C, bei dem eine ungenügende Zellzahl für den zweiten Testdurchgang vorlag- in das Patientenkollektiv aufgenommen wurde. Bei Proband C* zeigt der TB- Spot mit ≤ 5 Spots ein negatives Ergebnis; bei den anderen vier Patienten mit LTBI (Proband D-F sowie H) ergibt die Differenz aus (Panel A- Nullwert) und/oder die Differenz aus (Panel B- Nullwert) jeweils ≥ 6 Spots und somit jeweils ein positives Testergebnis. Der Vergleich der zwei Proben (Proband D und E), welche sowohl im ersten als auch im zweiten Durchgang jeweils mit einem positiven Ergebnis ausgewertet werden konnten, zeigt Proband D im zweiten Anlauf eine weit höhere Anzahl an Spots (insgesamt 283 Spots) gegen das Antigen ESAT-6 (Panel A) als beim vorherigen Versuch (19 Spots)- die restliche Spotauswertung fällt hingegen beide Male ähnlich aus. Bei Proband E ist hingegen genau das Gegenteil ersichtlich: In den Wells mit beiden Antigenen ist beim zweiten Versuch eine weit geringere Spotanzahl (8 bzw. 11 Spots) als beim ersten Versuch (371 bzw. 151 Spots) zu beobachten.

Beim zweiten Testdurchgang des *Dual- Color- ELISpot* erfolgt die Stimulation der PBMC mit den Antigenen ESAT-6 sowie CFP 10 analog zur Durchführung des *T- SPOT.TB™*. Bei der Ergebnisinterpretation fällt bereits mit freiem Auge eine hohe Anzahl an unspezifischen Hintergrundsignalen auf, sodass sämtliche Wells- bis auf ein einziges Well, welches mit hoher Wahrscheinlichkeit als Artefakt anzusehen ist- einen stark rötlich gefärbten Hintergrund aufweisen und mit einer überwiegenden Sekretion von IL-2 vergesellschaftet sind. Im Gegensatz dazu ist sowohl die alleinige Produktion an $IFN\gamma$ als auch die simultane Sekretion beider Zytokine ($IFN\gamma$ und IL-2) stark reduziert. Bei näherer

Betrachtung kann man zudem eine inhomogene Oberfläche bzw. Konsistenz in den einzelnen Wells feststellen, deren Muster bzw. Ausprägung zwischen den einzelnen Wells stark variiert und als Ausdruck einer Interferenz bzw. Inkompatibilität zwischen den Antigenen und der PVDF-Platte des Dual-Color-ELISpot gewertet werden kann. Ähnlich wie beim T-SPOT.TB™ zeigt auch der Nullwert bzw. das AIM-V beim Dual-Color-ELISpot bis auf einzelne wenige Ausnahmen eine hohe unspezifische Zellaktivierung. Aus den genannten Gründen gestaltet sich die Interpretation der Ergebnisse des Dual-Color-ELISpot nach entsprechender Antigen-Stimulation schwierig, sodass die Ergebnisse kaum verwertbar sind. Trotzdem sind tendenziell einige Parallelen zum T-SPOT.TB™ erkennbar: Proband C* zeigt sowohl beim Dual-Color-ELISpot als auch beim T-SPOT.TB™ keine Spots im Nullwert sowie nur sehr wenige Spots in den Wells mit den Antigenen; zudem ergibt sich auch bei Proband D und Proband H in beiden Fällen dasselbe Bild: Proband D zeigt in der Nullkontrolle wenige bis keine Spots, während in den Wells von Panel A eine hohe Zytokinsekretion vorliegt; bei Proband H hingegen ist sowohl in der Nullkontrolle als auch in Panel A bzw. Panel B eine geringe Spotanzahl nachweisbar. Generell weist der Patient mit der aktiven TBC-Infektion im Vergleich zu den restlichen Probanden in beiden Immunoassays mit Abstand die höchste Stimulationsrate bzw. Spotanzahl auf- unabhängig davon, ob es sich um Nullwert, Positivkontrolle oder Antigene handelt.

Aufgrund der geringen Prävalenz an TBC-Erkrankungen im Einzugsgebiet des Universitätsklinikums Graz umfasst die untersuchte Studienpopulation- neben gesunden Probanden- sechs Personen mit einer latenten tuberkulösen Infektion und einen einzigen Probanden mit einer aktiven (Lymphknoten-) Tuberkulose. Da das Ziel dieser Arbeit darin besteht, die etablierte Methodik des Single-Color-ELISpot hinsichtlich TBC-Diagnostik zu erweitern, wurde dieses Testverfahren nur an einer begrenzten Anzahl an Studienteilnehmern erprobt. Um die statistische Aussagekraft der Ergebnisse erhöhen und diese somit auf die Gesamtbevölkerung übertragen zu können, sind umfangreichere Studien nötig. Außerdem wurden in diesem Projekt die Auswirkungen einer immunsupprimierenden Dauertherapie sowie geschlechtsspezifische Unterschiede in Bezug auf die Stimulierung des Immunsystems und somit auf die Zytokinproduktion nicht mitberücksichtigt. Zudem könnten unterschiedliche Formen an Organ-Tuberkulosen möglicherweise mit einer unterschiedlichen Zytokinsekretion vergesellschaftet sein. All diese Teilaspekte könnten als Ausgangspunkte für weiterführende Studien dienen. Ferner bleibt der Effekt der Kryopräservierung der PBMC auf die Zytokinsekretion und die

Entstehung von unspezifischen Hintergrundsignalen sowohl beim T- SPOT.TB™ als auch beim Dual- Color- ELISpot unklar, obwohl es in der Literatur Hinweise dafür gibt, dass sowohl mit frischen PBMC als auch mit eingefrorenem Probenmaterial dieselben validen Ergebnisse bei ELISpot- Assays erzielt werden können und die Funktionalität der PBMC durch das Einfrieren nicht beeinträchtigt wird [78].

Eine Aussage darüber, ob das Dual- Color- ELISpot- Assay im Vergleich zum T- SPOT.TB™ zusätzliche Informationen hinsichtlich Zytokinproduktion liefern kann und somit indirekt Rückschlüsse auf die Krankheitsaktivität bzw. den jeweiligen Immunstatus zulässt, kann anhand der Ergebnisse dieses Projektes nicht getroffen werden. Außerdem ist es aufgrund der erschwerten Ergebnisinterpretation sowie des schmalen Patientenkollektives unmöglich, die Cut- Off- Werte bzw. Referenzbereiche zur Spotauswertung und Testinterpretation des Dual- Color- ELISpot- Assay festzulegen. Die erzielten Ergebnisse, insbesondere das Vorliegen einer hohen unspezifischen Zellaktivierung, könnten neben einer Inkompatibilität der verwendeten Testsubstanzen zusätzlich auf die Verwendung von eingefrorenen PBMC zurückzuführen sein. Auffällig ist die Tatsache, dass Proband C* als einziger von den zehn Studienteilnehmern keinerlei Spots im Nullwert aufzeigt und somit absolut konform mit den Voraussetzungen für die Testinterpretation ist. Dies könnte evtl. darauf zurückzuführen sein, dass die PBMC von Proband C* erst eine Woche vor dem Testbeginn eingefrorenen worden sind- im Vergleich zum übrigen Probenmaterial, welches im Durchschnitt bereits drei bis vier Monate vor der zweiten Testdurchführung gewonnen und tiefgefroren wurde. Ob der Zeitpunkt bzw. die Dauer der Kryopräservierung einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisinterpretation ausübt bzw. welche Testergebnisse im Vergleich dazu mit frisch isolierten PBMC erzielt werden können, bleibt zukünftigen Projekten bzw. Studien überlassen. Nachdem das Dual- Color- ELISpot- Assay seine Funktionsweise unter Verwendung von unstimulierten PBMC bewiesen hat; bei direkter Stimulation der PBMC mit den Antigenen ESAT-6 und CFP 10 in den Wells der PVDF- Platte allerdings eine Interferenz bzw. Inkompatibilität aufgetreten ist, empfiehlt sich im nächsten Testablauf die versuchsweise in- vitro- Stimulierung der PBMC mit diesen Antigenen bereits vor dem Einsetzen der PBMC in die Wells der antikörperbeschichteten Platte des Dual- Color- ELISpot.

Diese Arbeit kann als „Pilotstudie“ für zukünftige Projekte mit einer höheren Fallzahl, insbesondere mit einer höheren Anzahl an Personen mit einer aktiven Tuberkulose- Infektion, angesehen werden. Zukünftige Studien werden zeigen, ob die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit in einem größeren Patientenkollektiv bestätigt werden und ob sich

die Methodik des Dual- Color- ELISpot in weiterer Folge als Testverfahren zur routinemäßigen TBC- Diagnostik in der Praxis bewähren kann. Ferner wäre auch die Weiterentwicklung bzw. Adaptierung dieser Methodik zur Analyse der Effektivität der zellmedierten Immunantwort gegen bestimmte Impfstoffe bzw. Erreger denkbar, um eine bessere Kontrolle von Infektionen, insbesondere bei immunsupprimierten Personen und Personen mit Immundefekten, zu gewährleisten. So z.B. wäre der Einsatz des Carrierproteins CRM₁₉₇ des konjugierten Pneumokokken- Impfstoffes bzw. weiterer Antigene, deren Immunantwort ebenso auf CD4- positiven T- Zellen mit einem TH₁- dominanten Zytokinprofil basiert, anstelle der in dieser Arbeit verwendeten TBC- assoziierten Antigene ESAT-6 und CFP 10 vorstellbar.

6 Literaturverzeichnis

1. Glück T, Müller-Ladner U. Vaccination in patients with chronic rheumatic or autoimmune diseases. *Clin Infect Dis*. 2008 May 1;46(9): p. 1459-65.
2. Conti F, Rezai S, Valesini G. Vaccination and autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev*. 2008 Dec;8(2): p. 124-8.
3. Rubbert-Roth A. Vaccination in adult rheumatology. *Z Rheumatol*. 2007 Mar;66(2): p. 102-4,106-10.
4. Kavanaugh A. Infection prophylaxis in antirheumatic therapy: emphasis on vaccination. *Curr Opin Rheumatol*. 2009 Jul;21(4): p. 419-24.
5. Sowden E, Mitchell WS. An audit of influenza and pneumococcal vaccination in rheumatology outpatients. *BMC Musculoskelet Disord*. 2007 Jul 4;8: p. 58.
6. Keyser F. Choice of Biologic Therapy for Patients with Rheumatoid Arthritis: The Infection Perspective. *Curr Rheumatol Rev*. 2011 Feb;7(1): p. 77-87.
7. Rowland R, McShane H. Tuberculosis vaccines in clinical trials. *Expert Rev Vaccines*. 2011 May;10(5): p. 645-58.
8. Minassian AM, Rowland R, Beveridge NE, Poulton ID, Satti I, Harris S, et al. A Phase I study evaluating the safety and immunogenicity of MVA85A, a candidate TB vaccine, in HIV-infected adults. *BMJ Open*. 2011 Nov 14;1(2): p. e000223.
9. Cole GA. Interferon-gamma ELISPOT assay for the quantitative measurement of antigen-specific murine CD8+ T-cells. *Methods Mol Biol*. 2005;302:191-204.
10. Slota M, Lim JB, Dang Y, Disis ML. ELISpot for measuring human immune responses to vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2011 Mar;10(3): p. 299-306.
11. Pichler WJ, Peter HH. Kapitel 20 "Immunsystem". In Siegenthaler W, Blum HE, editors. *Klinische Pathophysiologie*. 9th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2006. p. 478-552.
12. Divekar AA, Zaiss DM, Lee FE, Liu D, Topham DJ, Sijts AJ, et al. Protein vaccines induce uncommitted IL-2-secreting human and mouse CD4 T cells, whereas infections induce more IFN-gamma-secreting cells. *J Immunol*. 2006 Feb 1;176(3): p. 1465-73.
13. Bejon P, Keating S, Mwacharo J, Kai OK, Dunachie S, Walther M, et al. Early gamma interferon and interleukin-2 responses to vaccination predict the late resting memory in malaria-naïve and malaria-exposed individuals. *Infect Immun*. 2006 Nov;74(11): p. 6331-8.
14. Semmo N, Day CL, Ward SM, Lucas M, Harcourt G, Loughry A, et al. Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology*. 2005 May;41(5): p. 1019-28.
15. Caccamo N, Guggino G, Joosten SA, Gelsomino G, Di Carlo P, Titone L, et al. Multifunctional CD4(+) T cells correlate with active Mycobacterium tuberculosis infection. *Eur J Immunol*. 2010 Aug;40(8): p. 2211-20.
16. Oxford Immunotec Limited. Packungsbeilage T-SPOT.TB 8 (CD-ROM). 2009. Bluttest zur Diagnostik einer Tuberkuloseinfektion.
17. R&D Systems. Packungsbeilage Dual- Color- ELISpot. 2011. Human IFN gamma/ IL-2 Kit, catalog number ELD4506.
18. Herold G, und Mitarbeiter. *Innere Medizin, eine vorlesungsorientierte Darstellung* 2012. Herold G, editor. Köln; 2012.
19. Kapetanovic MC, Saxne T, Sjöholm A, Truedsson L, Jönsson G, Geborek P. Influence of methotrexate, TNF blockers and prednisolone on antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccine in patients with rheumatoid arthritis.

- Rheumatology (Oxford). 2006 Jan;45(1): p. 106-11.
20. Feuchtenberger M, Kleinert S, Schwab S, Roll P, Scharbatke EC, Ostermeier E, et al. Vaccination survey in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Rheumatol Int*. 2011 Feb 15.
 21. Klinman D. ELISPOT assay to detect cytokine-secreting murine and human cells. *Curr Protoc Immunol*. 2008 Nov;Chapter 6:Unit 6.19.
 22. Zhang W, Caspell R, Karulin AY, Ahmad M, Haicheur N, Abdelsalam A, et al. ELISPOT assays provide reproducible results among different laboratories for T-cell immune monitoring-even in hands of ELISPOT-inexperienced investigators. *J Immunotoxicol*. 2009 Sep 25.
 23. Shata MT. Protocol online: ELISPOT. [Online].; 2009 [cited 2012 Aug 30]. Available from: <http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/ELISPOT-3456.html>.
 24. Melin M, Trzciński K, Meri S, Käyhty H, Väkeväinen M. The capsular serotype of *Streptococcus pneumoniae* is more important than the genetic background for resistance to complement. *Infect Immun*. 2010 Dec;78(12): p. 5262-70.
 25. Weinberger D, Harboe Z, Sanders E, Ndiritu M, Klugman K, Rückinger S, et al. Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2010 Sep 15;51(6): p. 692-699.
 26. Pletz MW, Maus U, Krug N, Welte T, Lode H. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaptation of the species. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Sep;32(3): p. 199-206.
 27. Rabian C, Tschöpe I, Lesprit P, Katlama C, Molina JM, Meynard JL, et al. Cellular CD4 T cell responses to the diphtheria-derived carrier protein of conjugated pneumococcal vaccine and antibody response to pneumococcal vaccination in HIV-infected adults. *Clin Infect Dis*. 2010 Apr 15;50(8): p. 1174-83.
 28. de Roux A, Schmöle-Thoma B, Siber GR, Hackell JG, Kuhnke A, Ahlers N, et al. Comparison of pneumococcal conjugate polysaccharide and free polysaccharide vaccines in elderly adults: conjugate vaccine elicits improved antibacterial immune responses and immunological memory. *Clin Infect Dis*. 2008 Apr 1;46(7): p. 1015-23.
 29. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, et al. Decline in Invasive Pneumococcal Disease after the Introduction of Protein–Polysaccharide Conjugate Vaccine. *N Engl J Med*. 2003 May 1;348(18): p. 1737-46.
 30. Esposito S, Tansey S, Thompson A, Razmpour A, Liang J, Jones TR, et al. Safety and Immunogenicity of a 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Compared to Those of a 7-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Given as a Three-Dose Series with Routine Vaccines in Healthy Infants and Toddlers. *Clinical and vaccine immunology*. 2010 Jun;17(6): p. 1017-1026.
 31. Chen Q, Cannons JL, Paton JC, Akiba H, Schwartzberg PL, Snapper CM. A novel ICOS-independent, but CD28- and SAP-dependent, pathway of T cell-dependent, polysaccharide-specific humoral immunity in response to intact *Streptococcus pneumoniae* versus pneumococcal conjugate vaccine. *J Immunol*. 2008 Dec 15;181(12): p. 8258-66.
 32. Malley R, Trzciński K, Srivastava A, Thompson CM, Anderson PW, Lipsitch M. CD4+ T cells mediate antibody-independent acquired immunity to pneumococcal colonisation. *PNAS*. 2005 Mar 29;102(13): p. 4848-4853.
 33. Schmid P, Selak S, Keller M, Luhan B, Magyarics Z, Seidel S, et al. Th17/Th1 biased immunity to the pneumococcal proteins PcsB, StkP and PsaA in adults of different age. *Vaccine*. 2011 May 23;29(23): p. 3982-9.

34. Baril L, Dietemann J, Essevez-Roulet M, Béniguel L, Coan P, Briles DE, et al. Pneumococcal surface protein A (PspA) is effective at eliciting T cell-mediated responses during invasive pneumococcal disease in adults. *Clin Exp Immunol.* 2006 Aug;145(2): p. 277-86.
35. Singh R, Singh S, Sharma PK, Singh UP, Briles DE, Hollingshead SK, et al. Helper T cell epitope-mapping reveals MHC-peptide binding affinities that correlate with T helper cell responses to pneumococcal surface protein A. *PLoS One.* 2010 Feb 25;5(2): p. e9432.
36. Wuorimaa T, Käyhty H, Eskola J, Bloigu A, Leroy O, Surcel HM. Activation of cell-mediated immunity following immunization with pneumococcal conjugate or polysaccharide vaccine. *Scand J Immunol.* 2001 Apr;53(4): p. 422-8.
37. Jakobsen H, Hannesdottir S, Bjarnarson SP, Schulz D, Trannoy E, Siegrist CA, et al. Early life T cell responses to pneumococcal conjugates increase with age and determine the polysaccharide-specific antibody response and protective efficacy. *Eur J Immunol.* 2006 Feb;36(2): p. 287-95.
38. Zhang Q, Bernatoniene J, Bagrade L, Paton JC, Mitchell T, Hammerschmidt S, et al. Regulation of production of mucosal antibody to pneumococcal protein antigens by T-cell-derived gamma interferon and interleukin-10 in children. *Infect Immun.* 2006 Aug;74(8): p. 4735-43.
39. Zhang Q, Choo S, Finn A. Immune responses to novel pneumococcal proteins pneumolysin, PspA, PsaA, and CbpA in adenoidal B cells from children. *Infect Immun.* 2002 Oct;70(10): p. 5363-9.
40. Ota MO, Oluwalana C, Howie SR, Gomez M, Ogunniyi A, Mendy-Gomez AL, et al. Antibody and T-cell responses during acute and convalescent stages of invasive pneumococcal disease. *Int J Infect Dis.* 2011 Apr;15(4): p. e282-8.
41. Lai Z, Schreiber JR. Antigen processing of glycoconjugate vaccines; the polysaccharide portion of the pneumococcal CRM(197) conjugate vaccine co-localizes with MHC II on the antigen processing cell surface. *Vaccine.* 2009 May 21;27(24): p. 3137-44.
42. van den Biggelaar AH, Richmond PC, Pomat WS, Phuanukoonnon S, Nadal-Sims MA, Devitt CJ, et al. Neonatal pneumococcal conjugate vaccine immunization primes T cells for preferential Th2 cytokine expression: a randomized controlled trial in Papua New Guinea. *Vaccine.* 2009 Feb 25;27(9): p. 1340-7.
43. Kamboj KK, Kirchner HL, Kimmel R, Greenspan NS, Schreiber JR. Significant variation in serotype-specific immunogenicity of the seven-valent *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide-CRM197 conjugate vaccine occurs despite vigorous T cell help induced by the carrier protein. *J Infect Dis.* 2003 May 15;187(10): p. 1629-38.
44. Baxendale HE, Johnson M, Keating SM, Ashton L L, Burbidge P, Woodgate S, et al. Circulating pneumococcal specific plasma and memory B cells in the elderly two years after pneumococcal conjugate versus polysaccharide vaccination. *Vaccine.* 2010 Oct 4;28(42): p. 6915-22.
45. St Clair EW. Good and bad memories following rituximab therapy. *Arthritis Rheum.* 2010 Jan;62(1): p. 1-5.
46. Adler S, Krivine A, Weix J, Rozenberg F, Launay O, Huesler J, et al. Protective effect of A/H1N1 vaccination in immune-mediated disease-a prospectively controlled vaccination study. *Rheumatology (Oxford).* 2012 Apr;51(4): p. 695-700.
47. Brezinschek H, Hofstaetter T, Leeb B, Haindl P, Graninger W. Immunization of

- patients with rheumatoid arthritis with antitumor necrosis factor alpha therapy and methotrexate. *Curr Opin Rheumatol*. 2008 May;20(3): p. 295-9.
48. Coulson E, Saravanan V, Hamilton J, Long KS, Morgan L, Heycock C, et al. Pneumococcal antibody levels after pneumovax in patients with rheumatoid arthritis on methotrexate. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jul;70(7): p. 1289-91.
 49. Visvanathan S, Keenan G, Baker DG, Levinson AI, Wagner CL. Response to pneumococcal vaccine in patients with early rheumatoid arthritis receiving infliximab plus methotrexate or methotrexate alone. *J Rheumatol*. 2007 May;34(5): p. 952-7.
 50. Rahier JF, Moutschen M, van Gompel A, van Ranst M, Louis E, Segaeert S, et al. Vaccinations in patients with immune-mediated inflammatory diseases. *Rheumatology*. 2010 Oct;49(10): p. 1815-1827.
 51. Wright SA, Taggart AJ. Pneumococcal vaccination for RA patients on TNF-alpha antagonists. *Rheumatology (Oxford)*. 2004 Apr;43(4): p. 523.
 52. Kaine JL, Kivitz AJ, Birbara C, Luo AY. Immune responses following administration of influenza and pneumococcal vaccines to patients with rheumatoid arthritis receiving adalimumab. *J Rheumatol*. 2007 Feb;34(2): p. 272-9.
 53. Elkayam O, Caspi D, Reitblatt T, Charboneau D, Rubins JB. The effect of tumor necrosis factor blockade on the response to pneumococcal vaccination in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Semin Arthritis Rheum*. 2004 Feb;33(4): p. 283-8.
 54. Bingham C O III, Looney RJ, Deodhar A, Halsey N, Greenwald M, Coddling C, et al. Immunization responses in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab: results from a controlled clinical trial. *Arthritis Rheum*. 2010 Jan;62(1): p. 64-74.
 55. de Roux A, Schmidt N, Rose M, Zielen S, Pletz M, Lode H. Immunogenicity of the pneumococcal polysaccharide vaccine in COPD patients. The effect of systemic steroids. *Respir Med*. 2004 Dec;98(12): p. 1187-94.
 56. Ulinski T, Leroy S, Dubrel M, Danon S S, Bensman A. High serological response to pneumococcal vaccine in nephrotic children at disease onset on high-dose prednisone. *Pediatr Nephrol*. 2008 Jul;23(7): p. 1107-13.
 57. Tay L, Leon F, Vratsanos G, Raymond R, Corbo M. Vaccination response to tetanus toxoid and 23-valent pneumococcal vaccines following administration of a single dose of abatacept: a randomized, open-label, parallel group study in healthy subjects. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(2):R38.
 58. Rehnberg M, Brisslert M, Amu S, Zendjanchi K, Håwi G, Bokarewa M. Vaccination response to protein and carbohydrate antigens in patients with rheumatoid arthritis after rituximab treatment. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(3):R111.
 59. Fomin I, Caspi D, Levy V, Varsano N, Shalev Y, Paran D, et al. Vaccination against influenza in rheumatoid arthritis: the effect of disease modifying drugs, including TNF alpha blockers. *Ann Rheum Dis*. 2006 Feb;65(2): p. 191-194.
 60. Del Porto F, Laganà B, Biselli R, Donatelli I, Campitelli L, Nisini R, et al. Influenza vaccine administration in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Safety and immunogenicity. *Vaccine*. 2006 Apr 12;24(16): p. 3217-23.
 61. Salemi S, Picchianti-Diamanti A, Germano V, Donatelli I, Di Martino A, Facchini M, et al. Influenza vaccine administration in rheumatoid arthritis patients under treatment with TNFalpha blockers: safety and immunogenicity. *Clin Immunol*. 2010 Feb;134(2): p. 113-20.
 62. van Assen S, Holvast A, Benne CA, Posthumus MD, van Leeuwen MA, Voskuyl AE, et al. Humoral Responses After Influenza Vaccination Are Severely Reduced in

- Patients With Rheumatoid Arthritis Treated With Rituximab. American college of rheumatology. 2010 Jan;62(1): p. 75-81.
63. Oren S, Mandelboim M, Braun-Moscovici Y, Paran D, Ablin J, Litinsky I, et al. Vaccination against influenza in patients with rheumatoid arthritis: the effect of rituximab on the humoral response. *Ann Rheum Dis*. 2008 Jul;67(7): p. 937-41.
 64. von Wagner M, Zeuzem S. Prevention and therapy of reactivation of hepatitis B in immunosuppressed patients. *Dtsch Med Wochenschr*. 2009 Feb;134(6): p. 255-8.
 65. Elkayam O, Yaron M, Caspi D. Safety and efficacy of vaccination against hepatitis B in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2002 Jul;61(7): p. 623-5.
 66. Geier D, Geier MR. A case-control study of serious autoimmune adverse events following hepatitis B immunization. *Autoimmunity*. 2005 Jun;38(4): p. 295-301.
 67. Heijstek MW, Pileggi GC, Zonneveld-Huijssoon E, Armbrust W, Hoppenreijns EP, Uiterwaal CS, et al. Safety of measles, mumps and rubella vaccination in juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2007 Oct;66(10): p. 1384-1387.
 68. Harpaz R, Ortega-Sanchez IR, Seward JF, Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of herpes zoster: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2008 Jun 6;57(RR-5): p. 1-30; quiz CE2-4.
 69. Oxman MN. Zoster vaccine: Current status and future prospects. *Clin Infect Dis*. 2010 Jul 15;51(2): p. 197-213.
 70. Kwakernaak AJ, Houtman PM, Weel JF, Spoorenberg JP, Jansen TL. A comparison of an interferon-gamma release assay and tuberculin skin test in refractory inflammatory disease patients screened for latent tuberculosis prior to the initiation of a first tumor necrosis factor α inhibitor. *Clin Rheumatol*. 2011 Apr;30(4): p. 505-10.
 71. Venkataswamy MM, Goldberg MF, Baena A, Chan J, Jacobs WRJ, Porcelli SA. In vitro culture medium influences the vaccine efficacy of Mycobacterium bovis BCG. *Vaccine*. 2012 Feb 1;30(6): p. 1038-49.
 72. Toussirot E, Wendling D. Bacillus calmette-guérin vaccination in a patient treated with infliximab. *J Rheumatol*. 2005 Dec;32(12): p. 2500-1.
 73. Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K, et al. Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection - United States, 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010 Jun 25;59(RR-5): p. 1-25.
 74. Chee CB, Gan SH, Khinmar KW, Barkham TM, Koh CK, Liang S, et al. Comparison of sensitivities of two commercial gamma interferon release assays for pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 2008 Jun;46(6): p. 1935-40.
 75. Cellestis.com. [Online]. [cited 2012 Aug 30]. Available from: <http://www.cellestis.com/IRM/Company/ShowPage.aspx?CPID=1414>.
 76. C.T.L. Cellular Technology Limited. Protocols and guidelines for working with human PBMC in ELISpot assays. 2012. Immunospot The exact science of ELISpot.
 77. BD Biosciences. BD Pharmingen Technical Data Sheet Annexin V- FITC Apoptosis Detection Kit I. 2006. Katalognummer 556547.
 78. Kreher CR, Dittrich MT, Guerkov R, Boehm BO, Tary-Lehmann M. CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. *J Immunol Methods*. 2003 Jul;278(1-2): p. 79-93.

