

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ertan Mayatepek

**Detektion von mycobakteriellen Erregern bei  
Lymphadenopathien unklarer Ätiologie im Kindesalter**

**DISSERTATION**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von:

Da-Un Chung  
aus Düsseldorf

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Marc Jacobsen
Zweitgutachter:	Prof. Dr. med. Colin R. MacKenzie

Für meine Eltern & Familie, die mich auf diesem Weg unermüdlich  
unterstützt und ermutigt haben.

*“Success is not final, failure is not fatal: it is the courage to continue that counts”*

- *Winston Churchill*

## Zusammenfassung

Die zervikale Lymphadenopathie (LAP) im Kindesalter stellt eine der häufigsten Symptome im pädiatrischen Klinikalltag dar. In den meisten Fällen handelt es sich um eine reaktive LAP durch bakterielle oder virale Infektionen, aber auch onkologische und immunologische Ursachen sind nicht selten. Aufgrund der unterschiedlichen therapeutischen Konsequenzen der Ursachen besteht die Dringlichkeit einer zügigen und korrekten Diagnosestellung. Speziell die Differentialdiagnostik der mycobakteriellen LAP stellt aufgrund der unspezifischen Klinik und des schwierigen kulturellen Nachweises der verschiedenen Erreger ein kritisches Problem dar. Die Kreuzreaktivität der diagnostisch verfügbaren mycobakteriellen Proteinextrakte (PPD) limitiert bislang u.a. die Möglichkeiten einer zuverlässigen immunologischen Differenzierung. Magdorf *et al.* gelang es dennoch durch den differentiellen Einsatz von mycobakteriellen PPD nicht-tuberkulöse Mycobakterien (NTM) und *M. tuberculosis* (MTB) als auslösenden Erreger in unterschiedlichen Patientenpopulationen mit LAP zu zuzuordnen. Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer sensitiven und spezifischen Methode für den immunologischen Nachweis von NTM als Ursache einer LAP unklarer Ätiologie im Kindesalter. Es sollte untersucht werden, ob die komparative Analyse von Zytokinantworten stimulierter T-Zellen auf verschiedene mycobakterielle PPD zur Identifizierung von NTM beiträgt. Darüber hinaus sollten der Einfluss unterschiedlicher Stimulationsansätze auf die Effektivität der Methode geprüft, sowie neue Zytokine identifiziert werden, welche für weitere immunologische Tests geeignet sein könnten. Es wurde ein Studienkollektiv von 25 Kindern rekrutiert und in die Gruppen „NTM-LAP“ für Patienten mit nachgewiesener mycobakterieller Ursache ihrer LAP, „Non-NTM-LAP“ für Patienten mit nachgewiesener, nicht-mycobakterieller Ursache ihrer LAP und in die Gruppe der „Verdachtsfälle“ für Patienten mit LAP unklarer Ätiologie zugeordnet. Aus heparinisierten Vollblutproben wurden mononukleare Zellen (PBMC) isoliert, welche sowohl in Kurzzeit-Stimulationsansätzen, als auch in Langzeit-Restimulationsansätzen mit PPD Tuberculin und PPD Sensitin *in vitro* inkubiert wurden. Nach intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS) folgte die durchflusszytometrische Untersuchung auf spezifische Zytokinantworten. Des Weiteren wurden Überstände aus PBMC-Kulturen und Vollblut-Proben ebenfalls mit mycobakteriellen PPD *in vitro* inkubiert und die gewonnenen Überstände mit CBA und ELISA auf spezifische Zytokinprofile untersucht. In der Durchflusszytometrie zeigten 4/4 Patienten der „NTM-LAP“-Gruppe eine deutlich höhere Zytokinantwort i.S. einer IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  Ko-Expression auf PPD Sensitin, als auf PPD Tuberculin. In der Gruppe der „Verdachtsfälle“ zeigten 4/7 Patienten, in der „Non-NTM-LAP“-Gruppe 1/8 entsprechende Zytokinantworten. Die Langzeit-Restimulation führte zu einer deutlichen Steigerung der stimulierten Zytokinantworten. Im CBA und ELISA zeigten sich nur für IFN- $\gamma$  im stimulierten Vollblut spezifische Konzentrationen, welche auf eine NTM-Infektion zurückzuführen waren. Für IP-10 im stimulierten Vollblut zeigte sich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen der gemessenen Zytokinantwort und einer NTM-Infektion. Weitere getestete Zytokine, wie u.a. MIP-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  zeigten keinen solchen Zusammenhang. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der durchflusszytometrische Nachweis von Zytokinantworten multifunktionaler T-Zellen nach Stimulation mit mycobakteriellen Proteingemischen die Identifizierung von LAP mycobakterieller Genese in pädiatrischen Patienten möglich macht. Die Langzeit-Restimulation führt, unter einem potentiellen Verlust der Spezifität, zu einer Sensitivitätssteigerung der Methode. Neben IFN- $\gamma$  könnte IP-10 als potentiell neuer Marker zukünftig zur verbesserten Diagnostik mycobakterieller LAP beitragen. Für eine optimierte Immundiagnostik wären weitere Experimente mit multifunktionalen T-Zellen und spezies-spezifischen Antigenen wünschenswert, wie sie bereits in der Tuberkulose-Diagnostik genutzt werden.

## Summary

Cervical lymphadenopathy (LAP) is one of the most common clinical symptoms in day-to-day pediatric clinical practice. In most cases reactive LAP in response to bacterial or viral infections is diagnosed, but oncological or immunological causes are also common. A timely and exact diagnosis is paramount due to the different diagnostic and therapeutic consequences of the many respective etiologies. Especially, LAP caused by mycobacteria poses a diagnostic challenge, because of unspecific symptoms and difficult detection by bacterial culture. The cross-reactivity of the commercially available mycobacterial purified protein derivatives (PPD) currently limits the development of sufficient methods for immunological differentiation. Despite this, Magdorf *et al.* were able to immunologically identify non-tuberculous mycobacteria (NTM) and *M. tuberculosis* (MTB) as causative pathogens in different patient populations with LAP by utilizing different mycobacterial PPD.

The aim of this study was to establish a sensitive and specific immunological method to detect NTM as causative pathogens in pediatric cervical LAP of unknown etiology. Therefore, a comparative cytokine-analysis of stimulated T-cell responses to different mycobacterial PPD was designed, in order to identify NTM-infected patients. Secondary objectives were to test the influence of different stimulation protocols on method efficacy and the identification of novel cytokines, which could be utilized in further studies.

We recruited 25 pediatric patients with LAP and divided them into three study groups labeled “NTM-LAP” for patients with confirmed NTM infection, “Non-NTM-LAP” for patients with confirmed non-mycobacterial cause of LAP and “suspected cases” for patients with unknown cause of LAP. Heparinized whole blood specimens were collected in order to isolate mononuclear cells (PBMC). The cells were stimulated *in vitro* with mycobacterial PPD in short-term incubation assays and in long-term re-stimulation assays. After intracellular cytokine staining (ICS) the cells were then analyzed with flow cytometry for specific cytokine responses. In addition, supernatants of PBMC cultures and whole blood stimulated *in vitro* with mycobacterial PPD, were collected and analyzed for specific cytokine responses with cytometric bead array (CBA) and enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA).

Flow cytometry showed 4 of 4 patients in the “NTM-LAP” group with markedly higher cytokine responses to stimulation with PPD sensitin, in terms of IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  co-expressing T-cells, than to PPD tuberculin. In the group of “suspected cases” 4 of 7 patients and in the “Non-NTM-LAP” group 1 of 8 patients, demonstrated respective cytokine responses. The long-term re-stimulation assay increased the measured cytokine responses markedly. CBA and ELISA revealed IFN- $\gamma$  as the only cytokine with a specific increase in cytokine concentration to NTM infection in stimulated whole blood. Further analyses showed an association between increased IP-10 concentrations in stimulated whole blood and NTM infection, which did not suffice for statistical significance. The measured concentrations of other tested cytokines, i.a. MIP-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$ , did not show any specific associations in these experiments.

In summary, this study shows that the specific cytometric detection of T-cell cytokine responses after stimulation with mycobacterial PPD is able to identify mycobacterial causes of LAP in children. The long-term re-stimulation assay improved method sensitivity at the cost of specificity. IP-10 could possibly contribute as a specific marker in the diagnostics of mycobacterial infections. Further research on multi-functional T-cells and the use of species-specific antigens, as already utilized in the diagnostics of tuberculosis, are needed and would greatly advance the immunological and diagnostic methods for mycobacterial infections in the future.

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AIDS</b>	<i>Acquired immuno-deficiency Syndrome</i>
<b>AK</b>	Antikörper
<b>APC</b>	<i>Antigen-presenting cell</i>
<b>ATS</b>	<i>American Thoracic Society</i>
<b>BCG</b>	<i>Bacille Calmette-Guérin</i>
<b>BCIP</b>	5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphat p-Toluidin-Salz
<b>B-Lymphozyten</b>	<i>Bonemarrow-matured lymphocytes</i>
<b>CBA</b>	<i>Cytometric Bead Array/Assay</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CF</b>	<i>Cystic fibrosis</i> (Zystische Fibrose / Mucoviszidose)
<b>CFP-10</b>	<i>Culture Filtrate Protein 10</i>
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus
<b>COPD</b>	Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
<b>DNA</b>	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
<b>EBV</b>	Ebstein-Barr Virus
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immuno-sorbent Assay</i>
<b>ELISPOT</b>	<i>Enzyme-linked immunospot</i>
<b>ESAT-6</b>	<i>Early secreted antigenic target-6</i>
<b>ETM</b>	Ethambutol
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
<b>FSC</b>	<i>Forward Scatter</i>
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte-/Monocyte colony stimulating factor</i>
<b>HAART</b>	<i>Highly active anti-retroviral therapy</i>
<b>HIV</b>	Humanes Immundefizienz Virus
<b>HRP</b>	<i>Horserraddish Peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
<b>ICS</b>	<i>Intracellular cytokine staining</i>
<b>IDSA</b>	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon $\gamma$
<b>IgA</b>	Immunglobulin A
<b>IGRA</b>	<i>Interferon-<math>\gamma</math>-release assay</i>
<b>IL</b>	Interleukin
<b>INH</b>	Isoniazid
<b>IP-10</b>	Interferon-induziertes Protein 10
<b>kDA</b>	Kilo-Dalton
<b>LAP</b>	Lymphadenopathie

<b>LTBI</b>	Latente Tuberkulose-Infektion
<b>MAC/MAI</b>	<i>Mycobacterium avium/intracellulare</i> -Komplex
<b>MFI</b>	<i>Mean fluorescens intensity</i> (Mittlere Fluoreszenz Intensität)
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	<i>Macrophage inflammatory protein 1<math>\alpha</math></i>
<b>MSSA</b>	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
<b><i>M. tuberculosis</i> (MTB)</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>NBT</b>	<i>Nitro-Blue</i> Tetrazolium
<b>NK-Zellen</b>	Natürliche Killerzellen
<b>NTM</b>	Nicht-Tuberkulöse Mycobakterien
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
<b>PHA</b>	Phytohämagglutinin
<b>PPD</b>	<i>Purified Protein Derivative</i>
<b>PZA</b>	Pyrazinamid
<b>RD-1</b>	<i>Region of Difference 1</i>
<b>RKI</b>	Robert Koch-Institut
<b>RMP</b>	Rifampicin
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
<b>SEB</b>	Staphylokokken Enterotoxin B
<b>spp.</b>	<i>Species pluralis</i>
<b>SSC</b>	<i>Side Scatter</i>
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>
<b>THT</b>	Tuberkulin Hauttest
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i>
<b>T-Lymphozyten</b>	Thymus-gereifte Lymphozyten
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
<b>TU</b>	<i>Tuberculin Unit</i>
<b>USA</b>	<i>United States of America</i> (Vereinigte Staaten von Amerika)
<b>VB</b>	Vollblut
<b>VZV</b>	Varizella-Zoster-Virus
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>I</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>II</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1 ZERVIKALE LYMPHADENOPATHIEN IM KINDESALTER	1
1.2 MYCOBACTERIOSEN ALS URSACHE VON LYMPHADENOPATHIEN	2
1.2.1 <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> ALS ERREGER DER TUBERKULOSE	3
1.2.1.1 EPIDEMIOLOGIE DER TUBERKULOSE	3
1.2.1.2 ÜBERTRAGUNGSWEGE UND KLINIK DER TUBERKULOSE	3
1.2.2 NICHT-TUBERKULÖSE MYCOBAKTERIEN	4
1.2.2.1 EPIDEMIOLOGIE & KLINIK VON NICHT-TUBERKULÖSEN MYCOBACTERIOSEN	5
1.2.2.2 ZERVIKALE LYMPHADENOPATHIE DURCH NICHT-TUBERKULÖSE MYCOBAKTERIEN	5
1.3 IMMUNREAKTIONEN GEGEN MYCOBACTERIELLE ERREGER	6
1.3.1 GRANULOME	7
1.3.2 WEITERE ZYTOKINE IN DER IMMUNREAKTION GEGEN MYCOBAKTERIEN	8
1.4 DIAGNOSTIK VON MYCOBACTERIELLEN INFESTIONEN	8
1.4.1 IMMUNOLOGISCHE HAUTTESTS	9
1.4.1.1 TUBERCULIN-HAUTTEST	9
1.4.1.2 DUALE HAUTTESTS	10
1.4.2 IMMUNOLOGISCHE <i>IN VITRO</i> TESTS	11
1.5 WEITERE IMMUNOLOGISCHE BIOMARKER BEI MYCOBACTERIOSEN	12
1.6 THERAPIE VON MYCOBACTERIELLEN INFESTIONEN	13
1.6.1 THERAPIE DER TUBERKULOSE	13
1.6.2 THERAPIE VON INFESTIONEN MIT NICHT-TUBERKULÖSEN MYCOBAKTERIEN	13
1.6.2.1 THERAPIE DER LYMPHADENITIS DURCH NICHT-TUBERKULÖSEN MYCOBAKTERIEN	14
1.7 ZIELSETZUNG	14
<b>2 MATERIAL &amp; METHODEN</b>	<b>16</b>
2.1 MATERIAL	16
2.1.1 LABORGERÄTE	16
2.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	16
2.1.3 CHEMIKALIEN & REAGENZIEN	17
2.1.4 ANTIKÖRPER	18
2.1.5 STIMULANTIEN	19
2.1.6 KITS	19
2.1.7 MEDIEN & LÖSUNGEN	20
2.1.9 SPENDERZELLEN	20
2.1.10 SOFTWARE	21
2.2 METHODEN	22
2.2.1 EINTEILUNG DER STUDIENTEILNEHMER	22
2.2.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	23
2.2.2.1 KURZZEIT-STIMULATION IM VOLLBLUT	23
2.2.2.2 ISOLIERUNG VON PBMCS AUS DEM VOLLBLUT	24
2.2.2.3 ZELLZAHLBESTIMMUNG	25
2.2.2.4 KURZZEITSTIMULATION & LANGZEIT-RESTIMULATION VON ISOLIERTEN PBMCS	25
2.2.2.5 VIABILITÄTSFÄRBUNG	26
2.2.2.6 FIXATION & PERMEABILISIERUNG DER ZELLEN	27
2.2.2.7 ANTIKÖRPERFÄRBUNG DER ZELLEN	28
2.2.2.8 DURCHFLUSS-ZYTOMETRISCHE ANALYSE	28

2.2.2.9	KRYO-KONSERVIERUNG VON PBMCs	30
2.2.2.10	AUFTAUEN VON KRYO-KONSERVIERTEN PBMCs	31
2.2.2.11	T-SPOT®.TB-ASSAY	31
2.2.2.12	ZYTOKIN-MESSUNG AUS ZELLKULTURÜBERSTÄNDEN UND SERUM	32
2.2.2.12.1	MESSUNG MIT CYTOMETRIC BEAD ARRAY® (CBA)	32
2.2.2.12.2	MESSUNG MIT ENZYME-LINKED IMMUNO-SORBENT ASSAY (ELISA)	35
2.2.3	STATISTISCHE ANALYSE	39
<b>3</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>ANALYSEN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON MYCOBAKTERIELLEN INFESTIONEN</b>	<b>41</b>
3.1.1	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNG VON INTRAZELLULÄREN ZYTOKINEN (ICS) IN T-ZELLEN NACH KURZZEIT-STIMULATION MIT MYCOBAKTERIELLEN ANTIGENEN	41
3.1.2	LANGZEIT-RESTIMULATION & DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNG VON T-ZELLEN MIT MYCOBAKTERIELLEN ANTIGENEN	43
3.1.3	KOMPARATIVE ANALYSE & KORRELATION DER DATEN AUS DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE	46
<b>3.2</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG VON WEITEREN ZYTOKINEN FÜR DEN NACHWEIS VON MYCOBAKTERIELLEN INFESTIONEN</b>	<b>48</b>
3.2.1	ZYTOKINAUSWAHL FÜR DEN CYTOMETRIC BEAD ARRAY® (CBA) UND ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)	48
3.2.2	ZYTOKINANALYSEN IN BESTÄTIGTEN NTM-INFESTIONEN IM CBA	50
3.2.3	ZYTOKINANALYSEN IN BESTÄTIGTEN NTM-INFESTIONEN IM ELISA	53
3.2.4	ZYTOKINANALYSEN IN LAP UNKLARER & NICHT-MYCOBAKTERIELLER ÄTIOLOGIE IM CBA	56
3.2.5	ZYTOKINANALYSEN IN LAP UNKLARER & NICHT-MYCOBAKTERIELLER ÄTIOLOGIE IM ELISA	59
3.2.6	KOMPARATIVE ANALYSEN DER DATEN AUS CBA UND ELISA	62
<b>3.3</b>	<b>ERGEBNISSE IM ÜBERBLICK</b>	<b>66</b>
<b>4</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>68</b>
<b>4.1</b>	<b>DURCHFLUSSZYTOMETRIE ZUR DETEKTION VON MYCOBAKTERIELLEN INFESTIONEN</b>	<b>68</b>
<b>4.2</b>	<b>ZYTOKINANALYSEN IM STIMULIERTEN VOLLBLUT UND PBMC-ÜBERSTÄNDEN</b>	<b>71</b>
4.2.1	ZYTOKINPROFILE DER „NTM-LAP“-GRUPPE	71
4.2.2	ZYTOKINPROFILE DER „VERDACHTSFÄLLE“ & „NON-NTM-LAP“-GRUPPE	71
<b>4.3</b>	<b>IP-10 ALS NEUER ZYTOKINKANDIDAT FÜR DIE DETEKTION VON NTM</b>	<b>73</b>
<b>4.4</b>	<b>LIMITATIONEN</b>	<b>74</b>
<b>4.5</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG</b>	<b>75</b>
<b>5</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>76</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>83</b>

# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 Zervikale Lymphadenopathien im Kindesalter**

Zervikale Lymphadenopathien (LAP) sind definiert als Schwellungen oder Vergrößerungen der Lymphknoten im Halsbereich größer als 1 cm im Durchmesser und können Ausdruck von verschiedensten Erkrankungen sein<sup>1-4</sup>. Insbesondere im Kindesalter sind LAP mit 38 bis 45% der Fälle sehr häufig als klinisches Symptom anzutreffen<sup>5</sup>. Besonders häufig zeigen sich diese dann im zervikalen Bereich (30-41%)<sup>6,7</sup>. Im Alter zwischen 4 und 8 Jahren zeigen sogar bis zu 90% aller Kinder palpable zervikale Lymphknoten<sup>1</sup>. Als häufigste Ursachen einer LAP im Kindesalter sind mit bis zu 57,5 bis 64,5% vor allem transiente reaktive Hyperplasien des lymphatischen Gewebes aufgrund von lokalen benignen inflammatorischen Prozessen, wie viralen oder bakteriellen Infektionen zu nennen<sup>8-10</sup>. Häufige virale Ursachen sind typischerweise die Erreger von oberen Atemwegsinfektionen, wie beispielsweise Adenoviren, Rhinoviren, Influenza- und Parainfluenzaviren<sup>8</sup>. Als weitere virale Erreger werden u.a. das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das Cytomegalievirus (CMV), als häufig beschriebene Ursachen einer reaktiven zervikalen LAP genannt (s. Tabelle 1.1)<sup>2,4</sup>. Zu den häufigsten bakteriellen Erregern einer akuten zervikalen LAP bzw. Lymphadenitis gehören  $\beta$ -hämolisierende Streptokokken (bis zu 80%), sowie *Staphylococcus aureus*<sup>11,12</sup>. Weitere seltenere bakterielle Ursachen sind Infektionen mit beispielsweise *Bartonella henselae*, der Erreger der Katzenkratz-Krankheit, sowie diverse Anaerobier-Spezies, *Francisella tularensis* und Mycobakterien-Stämme (s. Kap. 1.2)<sup>4,9,12,13</sup>. Andere sehr häufige pädiatrische Ursachen sind primär maligne Erkrankungen der Lymphknoten, wie der Morbus Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphome, sowie der sekundäre maligne Befall von Lymphknoten im Rahmen von Leukämien, Neuroblastomen, Rhabdomyosarkomen oder der metastatische Befall durch beispielsweise Schilddrüsen- oder Nasopharynx-Karzinomen<sup>4,14,15</sup>. In diversen Studien konnten im Rahmen von Biopsien oder durch Feinnadel-Aspirationszytologie 12-27% der LAP im Kindesalter auf maligne Ursachen zurückgeführt werden<sup>10,15</sup>. Erkrankungen aus dem rheumatologischen bzw. auto-immunen Formenkreis, wie z.B. das Kawasaki-Syndrom (mukokutanes Lymphknotensyndrom), die juvenile idiopathische Arthritis oder Kollagenosen führen ebenfalls häufig zu LAP im Kindesalter<sup>4,9,16</sup>. Als seltenere Vertreter aus der Gruppe werden weiterhin das Kikuchi-Fujimoto-Syndrom (histiozytär nekrotisierende Lymphadenitis) und das Rosai-Dorfman-Syndrom beschrieben<sup>17</sup>. LAP durch systemische Pilzinfektionen sind selten und vornehmlich bei immun-

supprimierten Kindern zu finden<sup>18-20</sup>. Parasitäre Ursachen einer LAP sind in unseren Breitengraden hauptsächlich auf Infektionen durch *Toxoplasma gondii* zurückzuführen<sup>21</sup>. Diverse Medikamente, wie Phenytoin, Isoniazid oder Allopurinol können ebenfalls Lymphknotenschwellungen als Ausdruck von systemischen Nebenwirkungen hervorrufen<sup>16,22</sup>. Differentialdiagnostisch sind angeborene Schwellungen oder Raumforderungen der Halsregion, wie beispielsweise mediane Halszysten (persistierender Ductus thyreoglossus), branchiogene Halszysten, Dermoid-Zysten, Laryngozeilen oder Halsrippen zu berücksichtigen<sup>23</sup>.

**Tabelle 1.1 – Ursachen einer zervikalen Lymphadenopathie im Kindesalter**

<b>Ursachen einer zervikalen Lymphadenopathie</b>			
<b>Virale Erreger:</b>	Adenoviren Rhinoviren Echoviren Influenza-Viren Parainfluenza-Viren Ebstein-Barr Virus (EBV) Cytomegalie-Virus (CMV) Varizella Zoster-Virus (VZV) Coxsackie-Viren HIV	<b>Maligne Erkrankungen:</b>	Lymphome Leukämien Neuroblastom Rhabdomyosarkom Metastasen
	<b>Bakterielle Erreger:</b>	β-hämolisierende Streptokokken Staphylococcus aureus div. Anaerobier spp. Bartonella henselae Francisella tularensis Mycobacterium tuberculosis Atypische Mycobakterien spp.	<b>Autoimmun-Erkrankungen:</b>
<b>Medikamente:</b>			Phenytoin Isoniazid Allopurinol Phenylbutazon Pyrimethamin
<b>Parasitäre Erreger:</b>	<i>Toxoplasma gondii</i>		

## 1.2 Mycobakteriosen als Ursache von Lymphadenopathien

Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt stellen mycobakterielle Infektionen eine relevante Differentialdiagnose im Falle von LAP im Kindesalter dar. Bei Mycobakterien handelt es sich um immobile, obligat aerobe Stäbchenbakterien, die durch Ihre spezielle Zellwand charakterisiert sind. Diese ist durch ihren hohen Gehalt und chemischer Konfiguration der namensgebenden, langkettigen Mycolsäuren und Arabinogalactan geprägt, welche der Zellwand eine äußerst hohe Widerstandsfähigkeit verleiht und somit gegenüber natürlichen Umwelttoxinen, aber auch dem humanen Immunsystem und gängigen antimikrobiellen Substanzen eine hohe Resistenz entgegenstellt<sup>24-26</sup>.

### **1.2.1 *Mycobacterium tuberculosis* als Erreger der Tuberkulose**

Zu den verbreitetsten humanpathogenen Vertretern dieser Gattung gehören *Mycobacterium (M.) tuberculosis*, der Erreger der Tuberkulose. *M. tuberculosis* wurde 1882 von Robert Koch erstmals isoliert und als Erreger der Tuberkulose identifiziert<sup>27</sup>. Als weitere seltenere Erreger der Tuberkulose werden *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii* und *M. microti* beschrieben. Zusammen bilden sie den taxonomisch und damit genetisch eng verwandten Mycobacterium-tuberculosis-Komplex<sup>28,29</sup>.

#### **1.2.1.1 Epidemiologie der Tuberkulose**

Die Tuberkulose ist eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit, welche nach dem *Global Tuberculosis Report 2015* mit jährlich 9,6 Millionen dokumentierten Neuinfektionen (Inzidenz: 133 : 100,000) und 1,5 Millionen verzeichneten Todesfällen im Jahre 2014, neben der Infektion mit dem Human Immundefizienz-Virus (HIV) eine der führenden globalen Todesursachen darstellt<sup>30</sup>. In Deutschland wurde 2014 durch das Robert-Koch Institut (RKI), mit 4488 Neuinfektionen, eine nationale Inzidenz von 5,6 : 100,000 Einwohner registriert. Darunter waren insgesamt 150 pädiatrische Fälle<sup>31</sup>. Für 2016 zeigte sich allerdings ein brisanter Anstieg der Inzidenz mit 5915 gemeldeten Fällen<sup>32</sup>. Als Ursache werden u.a. der demographische Wandel in der Bunderepublik, sowie die aktuellen Migrationsströme in Westeuropa diskutiert<sup>32-34</sup>.

#### **1.2.1.2 Übertragungswege und Klinik der Tuberkulose**

Der aerogene Übertragungsweg über infektiöse Aerosole stellt den häufigsten und wichtigsten Modus der Erregerverbreitung für die Tuberkulose dar<sup>35</sup>. Die Inhalation geringster Mengen der 0,65 - 4,70 µm messenden Mikrotröpfchen mit einem Inhalt von nur jeweils 1-3 Erregern, ist bereits ausreichend, um eine Infektion zu ermöglichen<sup>36-38</sup>. Diese werden zumeist von bereits pulmonal erkrankten Patienten ausgehustet oder auch nur mit der Atemluft beim Sprechen freigesetzt<sup>39,40</sup>. Bei dieser sogenannten offenen Lungentuberkulose haben die pulmonalen Tuberkuloseherde freien Anschluss an das Bronchialsystem und gelangen so in die Atemluft. Es ist daher nicht überraschend, dass der pulmonale Befall mit *M. tuberculosis* ebenfalls mit ca. 76% die häufigste und damit klinisch relevanteste Organmanifestation im Erwachsenenalter darstellt<sup>41,42</sup>. Als

zweithäufigste Manifestation wird die tuberkulöse Lymphadenitis genannt, wobei der Befall der zervikalen Lymphknoten (sogenannte Scrofula) mit ca. 57 bis 63% der Fälle, v.a. in pädiatrischen Patienten, am häufigsten anzutreffen ist<sup>43-45</sup>. Die Inzidenz der tuberkulösen Lymphadenitis im Kindesalter wird mit 0,5 : 100,000 beschrieben. Von infizierten Kindern geht generell ein geringes Infektionsrisiko aus, da selbst bei offenen Formen der Lungen-Tuberkulose, aufgrund des häufig paucibacillären Befall in pädiatrischen Patienten, die ausgeschiedene Erregerzahl sehr gering ist<sup>46-48</sup>.

Nach Infektion beträgt die durchschnittliche Inkubationszeit ca. 6-8 Wochen, in der auch noch keine messbare Immunreaktion des Organismus nachgewiesen werden kann (sog. präallergische Phase)<sup>49,50</sup>. Nur ca. 5-10% der immunkompetenten Infizierten entwickeln eine klinisch relevante und damit behandlungs-bedürftige Tuberkulose<sup>51,52</sup>. Die Latenzzeit bis zum klinischen Ausbruch kann bis zu mehrere Jahre bis Jahrzehnte dauern<sup>53-55</sup>. Im größten Teil der immunkompetenten Patienten kommt es zu einer adäquaten Immunreaktion und schließlich einer Abkapselung der Erreger in Form von sogenannten Granulomen (s. Kapitel 1.3.1). Dieser Zustand wird dann als sogenannte latente tuberkulöse Infektion (LTBI) bezeichnet. Diese Patienten bleiben asymptomatisch und sind nicht infektiös<sup>56,57</sup>. Allerdings kann es Jahre bis Jahrzehnte später noch, v.a. im Rahmen von Immunsuppression, zu einer Reaktivierung der Tuberkulose kommen. Das Lebenszeitrisiko für LTBI-Patienten beträgt in etwa 5-10%<sup>58</sup>.

### **1.2.2 Nicht-tuberkulöse Mycobakterien**

Als sogenannte Nicht-tuberkulöse Mycobakterien (NTM) werden eine große Gruppe von fakultativ-pathogenen Mycobakterien-Spezies subsummiert, welche als Umwelt-Kommensale ubiquitär in direkter Umgebung des Menschen, u.a. im Trinkwasser und Boden anzutreffen sind<sup>59,60</sup>. Sie ernähren sich überwiegend saprophytisch und stellen für immun-kompetente Erwachsene in der Regel keine pathogene Bedrohung dar. Aktuell sind dank moderner molekular-biologischer Methoden bislang 125 verschiedene NTM-Spezies identifiziert.<sup>61,62</sup> Bislang wurde angenommen, dass anders als bei *M. tuberculosis* weder Mensch-zu-Mensch-, noch Tier-zu-Mensch-Übertragungen beschrieben worden waren, so dass Infektionen mit NTM vermeintlich allein auf unspezifische Umwelt-Expositionen zurückzuführen sind<sup>63,64</sup>. Die Publikationen von Aitken *et al.* und Bryant *et al.* beschreiben jedoch die Möglichkeit einer direkten Übertragung zwischen bestimmten pneumologischen Patienten-Subpopulationen<sup>65,66</sup>.

### **1.2.2.1 Epidemiologie & Klinik von nicht-tuberkulösen Mycobakterien**

Nicht-Tuberkulöse Mycobakterien können sowohl symptomatische, als auch asymptomatische Infektionen verursachen. Studien mit immunologischen Hauttests und Antikörpertitern gegen NTM-Antigene in großen Stichproben aus den USA zeigten positive Reaktionen in einer Vielzahl von getesteten Individuen als Hinweis auf eine hohe Prävalenz an asymptomatisch durchgemachten NTM-Infektionen<sup>67,68</sup>. Klinische Manifestationen durch Infektionen mit NTM sind meistens nur bei systemisch immunsupprimierten Patienten oder jungen Kindern zu sehen<sup>69</sup>. Insgesamt scheint die Inzidenz an NTM-Infektionen in der HIV-negativen, erwachsenen Population jedoch stetig zuzunehmen<sup>70-73</sup>. Ob es sich um eine tatsächlichen absolute Zunahme oder eine erhöhte Wahrnehmung durch verbesserte diagnostische Möglichkeiten handelt, ist derzeit unklar<sup>74</sup>. Die am häufigsten beschriebene klinische Manifestation einer NTM-Infektion ist der pulmonale Befall<sup>75,76</sup>. Im Jahre 2006 konnte in den USA eine Prävalenz von 8,6 : 100,000 Einwohner in der Normalbevölkerung beschrieben werden<sup>77</sup>. Als häufigste Erreger werden *M. avium* und *M. intracellulare* beschrieben, welche aufgrund ihrer taxonomischen Nähe als MAC- oder MAI-Komplex zusammengefasst werden<sup>69,77</sup>. Als weitere häufige Isolate werden *M. kansasii* und *M. abscessus* genannt<sup>75</sup>. In den meisten Fällen liegen prädisponierende Faktoren, wie chronische strukturelle Lungenerkrankungen (z.B. COPD, Bronchiektasen, pulmonale Kavernen) oder eine immunsuppressive Therapie vor, welche den pulmonalen Befall begünstigen<sup>69,77</sup>. In 32% der Fälle lässt sich jedoch keine offensichtliche Suszeptibilität bzw. Prädisposition nachweisen<sup>72</sup>. In pädiatrischen Populationen sind vor allem Patienten mit Mukoviszidose (= Zystische Fibrose; *cystic fibrosis (CF)*) von pulmonalen Infektionen durch MAC oder *M. abscessus* mit einer Prävalenz von bis zu 13% betroffen<sup>63</sup>.

### **1.2.2.2. Zervikale Lymphadenopathie durch Nicht-tuberkulöse Mycobakterien**

In pädiatrischen Patienten zeigt sich die zervikale Lymphadenopathie mit 87% als häufigste Manifestation einer NTM-Infektion<sup>78</sup>. Am häufigsten betroffen sind Kinder im Alter zwischen 0-4 Jahren mit einer geschätzten jährlichen Inzidenz in westlichen Industrienationen von 2,3 – 3,3 : 100,000 Kindern mit einer wahrscheinlich durchaus höheren Dunkelziffer durch subklinische Verläufe ohne eindeutigen Erregernachweis<sup>69,78,79</sup>. Insgesamt nimmt die Inzidenz zu, auch wenn eine exakte

Bestimmung, aufgrund der im Gegensatz zur Tuberkulose nicht bestehenden Meldepflicht, nicht möglich ist<sup>78,80,81</sup>. Der am häufigsten isolierte Erreger ist mit ca. 80% MAC<sup>82,83</sup>. In den USA ist *M. scrofulaceum* ein weiteres häufiges Isolat<sup>76,82</sup>. In Europa wurden nach MAC die Erreger *M. malmoense* und *M. haemophilum* am häufigsten als Auslöser identifiziert<sup>84,85</sup>. Die NTM-Lymphadenitis präsentiert sich klinisch mit einer unilateralen, schmerzlosen Schwellung im präaurikulären, submandibulären oder zervikalen Bereich, meist ohne begleitende konstitutionelle Symptomatik. Die Lymphknoten zeigen häufig einen progredienten Verlauf mit Größenzunahme, livider Verfärbung der bedeckenden Haut, spontaner Ruptur und kutaner Fistelung<sup>76,78,82,86</sup>. In den meisten Fällen sind es diese chronisch-progredienten und therapierefraktären Verläufe, welche im Rahmen der klinischen Diagnostik erst an eine mycobakterielle Genese denken lassen. Als wichtigste Differentialdiagnose gilt die tuberkulöse Lymphadenitis, welche im klinischen Erscheinungsbild kaum von einer NTM-Lymphadenitis zu unterscheiden ist und so hinsichtlich der unterschiedlichen therapeutischen Konsequenzen der beiden Entitäten (s. Kapitel 1.6), ein relevantes diagnostisches Problem darstellt<sup>83,87</sup>.

### **1.3 Immunreaktionen gegen mycobakterielle Erreger**

Dringen Mycobakterien in den menschlichen Organismus ein werden diese von Makrophagen in der Lunge (Alveolarmakrophagen) oder der Haut über diverse pathogen-erkennende Oberflächenrezeptoren, wie *Toll-like* Rezeptor 2 (TLR2) erfasst und phagozytiert<sup>88,89</sup>. Die Pathogen-Rezeptor Interaktion, sowie die Phagozytose selbst resultiert in einer Kaskade von Signalen, u.a. die Sekretion von Interleukin (IL-) 12, welches zur weiteren Aktivierung und Proliferation von *Cluster of Differentiation* (CD) 4-positiven T-Helferzellen vom Typ 1 (T<sub>H</sub>1) und natürlichen Killer- (NK-) Zellen führt<sup>90-92</sup>. Diese produzieren im Gegenzug das Zytokin Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )<sup>93</sup>, welches u.a. zu einer weiteren Aktivierung der Makrophagen mit Verbesserung der Antigenpräsentation<sup>94</sup>, sowie effektiveren Zerstörung der phagozytierten Erreger über beschleunigte Ansäuerung der Phagosomen durch Fusion mit Lysosomen<sup>95,96</sup> und Aktivierung von Enzymsystemen zur Produktion von anti-mikrobiell wirksamen, reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, führt<sup>97,98</sup>. Des weiteren folgt eine verstärkte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1, *Granulocyte/Macrophage Colony stimulating Factor* (GM-CSF)<sup>99,100</sup> und wiederum mehr IL-12 im

Sinne einer positiven Verstärkung der Immunreaktion<sup>101</sup>. Es werden jedoch auch inhibitorische Zytokine, wie IL-4, IL-10, IL-13 und *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) produziert, welche kontrollierend in die Immunreaktion eingreifen<sup>102,103</sup>. Diese Zytokine regulieren weiterhin die Ausbildung von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen. Die Bedeutung von IFN-γ, TNF-α und IL-2 ko-exprimierenden, multifunktionalen T-Zellpopulationen als Ausdruck einer effektiven T<sub>H</sub>1-Zellantwort gegenüber intrazellulären Pathogenen, wie Mycobakterien konnte in diversen Arbeiten gezeigt werden<sup>104-107</sup>.

### **1.3.1 Granulome**

Ein weiterer essentieller Mechanismus im Rahmen der Immunreaktion gegen mycobakterielle Erreger ist die Granulombildung im Gewebe. Nach der Phagozytose der Erreger kommt es zur Abwanderung der Makrophagen in regionale Lymphknoten und ins umliegende Interstitium<sup>57</sup>. Granulome stellen das histo-pathologische Korrelat der lokalen Immunreaktion mit dem Ziel der Erregereindämmung und -zerstörung, aber auch des Gewebes Schadens dar. Ein Granulom bildet sich aus einem Kern aus erregerehaltigen Monozyten, Makrophagen, Epitheloidzellen und sog. mehrkernigen Langerhans-Riesenzellen, sowie einem Ring von T- und B-Lymphozyten und einer fibrotischen Kapsel zur Isolierung der Erreger vom umliegenden Gewebe<sup>57,108,109</sup>. Spezielle Kriterien zur histo-pathologischen Differenzierung von tuberkulösen und nicht-tuberkulösen Granulomen sind umstritten und werden in der Literatur kontrovers diskutiert<sup>110-112</sup>. Im Gegensatz zu tuberkulösen Granulomen scheinen nicht-tuberkulöse Granulome histologisch weniger organisiert und mit einer geringeren Anzahl an Epitheloidzellen und Langerhans-Riesenzellen, sowie einem geringeren Vorkommen an verkäsenden Nekrosen einherzugehen. Allerdings zeigten nicht-tuberkulöse Granulome eine höhere Dichte an Mikroabszessen<sup>110,113</sup>.

### **1.3.2 Weitere Zytokine in der Immunreaktion gegen Mycobakterien**

Neben den bereits genannten Zytokinen sind weitere Mediatoren an der Immunreaktion gegen mycobakterielle Erreger beteiligt und stellen mögliche Kandidaten für die immunologische Diagnostik von Mycobakteriosen dar. Interferon-induziertes Protein 10 (*Interferon-induced protein 10* - IP-10) ist ein Chemokin, welches von Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen nach Induktion durch IFN- $\gamma$  freigesetzt wird<sup>114-116</sup>. Es wirkt pleotrop mit u.a. chemotaktischen Eigenschaften auf stimulierte T<sub>H</sub>1-Zellen, NK-Zellen und Monozyten/Makrophagen, sowie stimulatorischen Effekten auf Zytolyse und Apoptose<sup>117,118</sup>. Im Falle von mycobakteriellen Infektionen scheint die Plasmakonzentration von IP-10 mit dem Schweregrad der Erkrankung zu korrelieren und wird als neuer potentieller diagnostischer Marker gehandelt<sup>119-121</sup>. Das Makrophagen-Inflammatorisches Protein 1 $\alpha$  (*Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$*  - MIP-1a) gehört ebenfalls zu der Familie der Chemokine, welches durch Monozyten und Makrophagen nach Induktion durch TNF- $\alpha$ , exprimiert wird<sup>122</sup>. Seine biologische Wirkung führt u.a. zur Rekrutierung von weiteren Monozyten, sowie aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen und dient als proliferativer und aktivierender Stimulus für Makrophagen<sup>123-125</sup>. Als wichtiges Zytokin in der zellulären Immunabwehr scheint es ebenfalls eine zentrale Rolle in der Immunreaktion gegen mycobakterielle Erreger zu spielen<sup>116</sup>.

### **1.4 Diagnostik von mycobakteriellen Infektionen**

Mycobakterielle Infektionen zeigen sich hinsichtlich der klinischen und radiographischen Präsentation, sowohl für den pulmonalen Befall, als auch für die Lymphadenitis sehr ähnlich, so dass es dem Kliniker zumeist nicht möglich ist eine eindeutige Zuordnung zwischen *M. tuberculosis* und NTM als auslösenden Erreger zu machen<sup>69</sup>. Der Goldstandard in der Diagnostik von mycobakteriellen Infektionen ist weiterhin der kulturelle Nachweis der Erreger aus Sputum oder Biopsiematerial, welcher auch von den entsprechenden Leitlinien gefordert wird<sup>69,126</sup>. Dieser gestaltet sich jedoch auch unter optimalen Bedingungen aufgrund des langsamen Stoffwechsels der Erreger, als äußerst langwieriger Prozess und kann 6 bis 8 Wochen oder länger andauern<sup>127</sup>. Insgesamt gelingt es nur in 50 – 82% der klinischen Verdachtsfälle ein kultureller Nachweis der Erreger<sup>82,128</sup>. Erschwerend kommt hinzu, dass es sich v.a. in pädiatrischen Patienten um paucibazilläre Infektionen handelt und generell nur eine geringe Erregerausscheidung

stattfindet<sup>46-48</sup>. Molekulargentische Untersuchungen, wie die *Polymerase Chain Reaction* (PCR) zum Nachweis von spezifischen mycobakteriellen DNA-Fragmenten aus geeignetem Material könnten den Erregernachweis unterstützen; sind aber noch nicht regelhaft etabliert und nur bedingt verfügbar<sup>129</sup>. Für den klinischen Alltag sind also schnellere, indirekte Verfahren nötig, um den initialen Verdachtsmoment zu bestätigen und Differentialdiagnostik weiter voran zu treiben. Hierbei kommen immunologische Verfahren zum Einsatz.

#### **1.4.1 Immunologische Hauttests**

##### **1.4.1.1 Tuberculin-Hauttest**

Der Tuberculin-Hauttest (THT) zur Diagnostik der Tuberkulose gehört zu den bekanntesten Hauttests und wird aufgrund seiner breiten Verfügbarkeit und einfachen Handhabbarkeit, sowie simpler Auswertungsmöglichkeit weiterhin weltweit angewandt. Den aktuellen Standard in Deutschland stellt der Mendel-Mantoux-Intrakutantest dar, bei dem 2 sogenannte Tuberculin-Einheiten (= *tuberculin units* - TU) eines standardisierten, aufgereinigten Antigengemischs von *M. tuberculosis* (*purified protein derivate* - PPD Tuberculin) in die Epidermis injiziert werden. Dieses, als RT23 deklarierte Standardgemisch wird seit 1958 am *Statens Serum Institute* in Kopenhagen produziert und gilt weiterhin als Standard-Tuberculin der WHO<sup>130</sup>. Hatte der Patient jemals Kontakt mit *M. tuberculosis* werden die injizierten Antigene von antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells* - APC), sowie T-Lymphozyten in der Haut erkannt und es folgt eine verzögerte kutane Immunreaktion (Typ-IV Reaktion nach Coombs & Gell) in Form einer scharf abgegrenzten Rötung und Schwellung (sog. Induration)<sup>131</sup>. Die Auswertung erfolgt 48 bis 72 Stunden nach Injektion über die Ausmessung des Durchmessers der Induration. Ein Durchmesser von  $\geq 10$  mm wird als positives Ergebnis gewertet<sup>132</sup>. Je nach Alter des Patienten oder epidemiologischem Hintergrund kann der diagnostische Grenzwert jedoch variieren<sup>133</sup>. Ein Problem des THT sind seine Einschränkungen im Bereich von Sensitivität und Spezifität. Die Rate an falsch-negativen Testergebnissen wird in der Literatur variierend zwischen 10-25% (Sensitivität: 75-90%) angegeben<sup>134,135</sup>. Als mögliche Ursachen werden z.B. schwere systemische Verläufe der Infektion oder andere Zustände der Immunsuppression, wie Unterernährung oder geringes Körpergewicht angeführt<sup>136</sup>. Des weiteren müssen Anergien i.R. von kürzlich applizierten Lebendimpfungen, sowie bei angeborenen bzw. erworbenen Immundefekten, z.B. durch

maligne Grunderkrankungen oder bei sehr jungen Säuglingen berücksichtigt werden<sup>133,137-139</sup>. Die Spezifität des THT wird ebenfalls als gering beschrieben. Überlappungen im Antigenpektrum zwischen PPD Tuberculin, dem früher als Tuberkulose-Impfstoff eingesetzten *Bacille Calmette-Guérin* (BCG) und non-tuberkulösen Mycobakterien (NTM) führen zu Kreuzreaktivität im THT, welche zu einer signifikanten Zahl an falsch-positiven Testergebnissen führt<sup>140,141</sup>. Eine Metaanalyse von Farhat *et al.* konnte zeigen, dass 21,2% von Kindern, welche nach ihrem ersten Lebensjahr mit BCG geimpft worden waren, nach 10 Jahren weiterhin mit einem falsch-positiven THT reagierten<sup>142</sup>. Eine weitere Metaanalyse von Wang *et al.* konnte die Ergebnisse in anderen Populationen bestätigen<sup>143</sup>. Allerdings zeigte die Publikation von Farhat *et al.* ebenfalls, dass vor ihrem ersten Lebensjahr BCG-geimpfte Säuglinge, nach 10 Jahren mit nur ca. 1% falsch-positiven THT auffallen und somit nur einen sehr geringen Effekt ausüben. Ebenso wurde gezeigt, dass je nach Region nur in 0,1 bis 2,3% der Fälle NTM als Ursache für falsch-positive Testergebnisse identifiziert werden konnte, so dass NTM nur in Gegenden mit geringer Prävalenz für Tuberkulose als diagnostischer Störfaktor tatsächlich relevant wird<sup>142</sup>. Von Reyn *et al.* konnten hingegen zeigen, dass mehr als 50% aller Tuberkulin-Hauttests bei Angestellten und Medizinstudenten im US-Gesundheitswesen, aufgrund von NTM als falsch positiv ausfallen<sup>144</sup>. Haimi-Cohen *et al.* zeigten, dass 59% von NTM-infizierten pädiatrischen Patienten eine deutlich positive Reaktion auf den THT demonstrierten. Keiner dieser Kinder war BCG-geimpft<sup>140</sup>.

#### **1.4.1.2 Duale Hauttests**

Um die diagnostische Spezifität zu verbessern, wurden Studien mit der simultanen intrakutanen Injektion eines aufgereinigten Antigengemisch von MAC (PPD Sensitin) und PPD Tuberculin durchgeführt. Zur Differenzierung wurde die absolute Differenz der Durchmesser der beiden entstehenden Indurationen gemessen. Eine Arbeitsgruppe um von Reyn *et al.* konnten zeigen, dass Patienten mit molekularbiologisch bestätigter NTM-Infektion durch diesen „dualen Hauttest“ mit einer Sensitivität von 73% und einer Spezifität von 97% von Patienten mit einer gesicherten tuberkulösen Infektion unterschieden werden können. Dabei wurde der diagnostische Grenzwert bei einer absoluten Differenz der beiden Indurationen von  $\geq 5$  mm festgelegt<sup>145,146</sup>. Diese Ergebnisse ließen sich ebenfalls für pädiatrische Populationen verschiedener Altersgruppen in Westeuropa reproduzieren<sup>147-149</sup>. Als limitierende Faktoren werden die

Variabilität der Testergebnisse je nach Fertigkeit und Trainingsstand des auswertenden Anwenders<sup>150</sup>, sowie, wie beim THT, die Notwendigkeit einer Wiedervorstellung nach 3 Tagen zur Testauswertung genannt<sup>151</sup>.

#### 1.4.2 Immunologische *in vitro* Tests

Die immunologischen *in vitro* Tests, wie der *Interferon- $\gamma$ -release assay* (IGRA) stellen die nächste Generation in der Diagnostik von tuberkulösen Infektionen dar und sollen die diagnostische Genauigkeit, sowie Handhabbarkeit sowohl für den Anwender, als auch den Patienten vereinfachen. IGRAs funktionieren nach dem Prinzip eines *Enzyme-linked immunospot* (ELISpot) oder *Enzyme-linked immuno-sorbent Assay* (ELISA) und messen semi-quantitativ die Konzentration von IFN- $\gamma$  in Vollblutproben von Patienten, welche zuvor mit den Antigenen *Early Secreted Antigenic Target-6* (ESAT-6), *Culture Filtrate Protein 10* (CFP-10) und für bestimmte Testsysteme zusätzlich mit dem Antigen TB7.7 stimuliert worden sind. Diese Antigene werden im Genom von *M. tuberculosis* im sogenannten *Region of Difference 1* (RD-1) codiert, welcher in BCG-Stämmen und den meisten NTM-Arten, außer *M. marinum*, *M. flavescens* und *M. szulgai*, deletiert ist<sup>152</sup>. Die entsprechenden Genprodukte sind demnach hoch spezifisch und wertvoll für die Diagnostik von *M. tuberculosis*<sup>152-154</sup>. In ihrer Sensitivität scheinen IGRAs mit ca. 71-97% vergleichbar mit dem THT zu sein, wobei in immunsupprimierten Kohorten eine höherer Sensitivität im Vergleich zum THT erreicht wird<sup>155-157</sup>. Die Spezifität wird in der Literatur hingegen mit ca. 90-100% beschrieben<sup>155</sup>. Die Notwendigkeit nur einer Vollblutprobe, sowie der standardisierten Durchführung und Auswertung des Tests stellen, neben der deutlich höheren Test-Spezifität deutliche Vorteile gegenüber dem THT dar.

Angelehnt an den dualen Hauttest führten Magdorf *et al.* Versuche mit *in vitro* Stimulationen von T-Zellen mit PPD Tuberkulin und PPD Sensitin durch und bestimmten die Anteile an IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 produzierenden T-Zellen im Durchflusszytometer. Die T-Zellen stammten aus Vollblutproben von Patienten mit nachgewiesener Tuberkulose oder NTM-Infektion<sup>158</sup>. Vergleich man die Zytokinantworten zwischen den beiden Patientenpopulationen auf die jeweiligen PPDs ergab sich, aufgrund der bekannten Kreuzreaktivität, zunächst keine ausreichende diagnostische Trennschärfe. Nach Gegenüberstellung der Zytokinantworten auf die jeweiligen PPDs innerhalb der Gruppen, zeigten sich im Mittel signifikante Unterschiede mit höheren Anteilen an

sensitiv-spezifischen T-Zellen in der NTM-Gruppe, sowie entsprechend mehr tuberkulin-spezifischen T-Zellen in der Tuberkulose-Gruppe. Aufgrund der großen Streubreite der einzelnen Antworten ergab sich jedoch auch hier keine Möglichkeit einer Diskriminierung mit der Definition eines diagnostischen Cut-Off für den individuellen Patienten. Erst die Bildung der Verhältnisse der Zytokinantworten auf die beiden Stimuli für den einzelnen Patienten zeigte signifikante Unterschiede ohne überlappende Werte, anhand dessen eine ätiologische Differenzierung in NTM-Infektion und Tuberkulose möglich wurde<sup>158</sup>. Steindor *et al.* führten ähnliche durchfluss-zytometrische Analysen mit PPD-stimulierten Vollblutproben von Mukoviszidose-Patienten mit und ohne bestätigter *M. abscessus*-Infektion durch. Die gemessenen T-Zellreaktionen konnten ebenfalls zuverlässig infizierte Patienten herausselektieren und machten durch die Bildung der Verhältnisse der Zytokinantworten auf die verschiedenen PPDs, eine Differentialdiagnose zwischen *M. abscessus*, *M. avium* und *M. tuberculosis* möglich<sup>159</sup>.

## **1.5. Weitere immunologische Biomarker bei Mycobakterien**

Weitere immunologische Biomarker in der Diagnostik von Mycobakterien sind beispielsweise Antikörper gegen mycobakterielle Antigene. So beschrieben Plum *et al.* das *M. avium*-spezifische Antigen MIG, gegen welches signifikant erhöhte Antikörperkonzentrationen in Seren von Patienten mit einer *M. avium*-Infektion nachwiesen werden konnte<sup>160</sup>. Die Arbeitsgruppe um Rolinck-Werningshaus *et al.* versuchte rekombiniertes MIG-Protein entsprechend als Antigen in einem Stimulations-Assay zu nutzen, welches jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit einer Tuberkulose, *M. avium*-Infektion und gesunden Kontrollen demonstrieren konnte<sup>161</sup>. Kitada *et al.* identifizierten einen spezifischen IgA-Antikörper gegen ein *M. avium*-spezifisches *Glycopeptidolipid-Core-Antigen*, welches signifikant erhöhte Serum-Konzentrationen in Patienten mit pulmonaler *M. avium*-Infektion im Vergleich zu Patienten mit pulmonaler Tuberkulose, anderen Lungenerkrankungen und gesunden Kontrollen zeigen konnte<sup>162</sup>. Die diagnostische Sensitivität und Spezifität lagen dabei bei entsprechenden 84,3% und 100%<sup>162,163</sup>.

## **1.6 Therapie von mycobakteriellen Infektionen**

### **1.6.1 Therapie der Tuberkulose**

Die Erstlinien-Therapie der Tuberkulose ist i.d.R. eine medikamentöse Kombinationstherapie aus den Substanzen Isoniazid (INH), Rifampicin (RMP), Ethambutol (ETM) und Pyrazinamid (PZA)<sup>126</sup>. Die Notwendigkeit einer Vierfach-Kombination ergibt sich aus den heterogenen Erreger-Populationen mit unterschiedlichen Stoffwechselaktivitäten je nach Beschaffenheit der tuberkulösen Läsion<sup>164</sup>. Die deutschen Leitlinien empfehlen für die Initialphase der Therapie die o.g. Vierfach-Kombination für die Dauer von 2 Monaten, gefolgt von einer Stabilisierungsphase von weiteren 4 Monaten mit INH und RMP<sup>126</sup>. Für unkomplizierte pädiatrische Fälle gilt die Empfehlung einer Dreifach-Kombination mit INH, RMP und PZA für 2 Monate, ebenfalls gefolgt von 4 Monaten INH und RPM<sup>126,165,166</sup>. Im Falle von Resistenzen oder Unverträglichkeiten gegen die o.g. Substanzen, kommt es zum Einsatz von Zweitlinien-Medikamenten, wie beispielsweise Amikacin, Capreomycin, Moxifloxacin, Protionamid oder Terizidon. Diese alternativen Therapieregime sind zumeist mit einer Verlängerung der Therapiedauer verbunden<sup>126,167</sup>. Chirurgische Maßnahmen werden nur in seltenen Fällen eingesetzt und sollten immer nach Experten-Rücksprache angewandt werden<sup>168,169</sup>.

### **1.6.2 Therapie von Infektionen mit Nicht-Tuberkulösen Mycobakterien**

Die therapeutischen Optionen bei einer Infektion mit NTM sind abhängig vom Ort des Befalls, sowie von der infizierenden Spezies. Die *American Thoracic Society* (ATS), sowie der *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) empfehlen bei pulmonalem Befall mit *MAC* eine Dreifachkombination aus einem modernen Makrolid (Clarithromycin oder Azithromycin), Rifampicin und Ethambutol für die Dauer von 12 Monaten nach Sputumkonversion<sup>69</sup>. Bei schweren Verläufen ist ggf. die Hinzunahme von Amikacin oder Streptomycin für die ersten 2-3 Monate der Therapie notwendig<sup>69</sup>. In Fällen mit nur unzureichendem Ansprechen auf die antibiotische Therapie, sowie bei Nachweis von Makrolid-resistenten Stämmen oder Komplikationen, wie beispielweise schwerer Hämoptysis, ist bei ausgewählten Patienten mit fokaler Infektion eine chirurgische Therapie mit Lungen(teil-)Resektion eine Option mit Hinweisen auf eine bessere

Prognose, verglichen mit einer alleinigen medikamentösen Therapie<sup>170,171</sup>. Aufgrund der nicht unerheblichen perioperativen Morbidität und Mortalität sollten diese Eingriffe nur in erfahrenen Zentren durchgeführt werden<sup>172-174</sup>.

#### **1.6.2.1 Therapie der Lymphadenitis durch Nicht-Tuberkulösen Mycobakterien**

Im Falle der zerviko-fazialen NTM-Lymphadenitis im Kindesalter spricht sich die US-amerikanische Leitlinie, unabhängig von der infizierenden Spezies, klar für die alleinige chirurgische Therapie ohne begleitende medikamentöse Therapie aus<sup>69,175</sup>. Eine große Studie von Lindeboom *et al.* aus den Niederlanden bestätigte die chirurgische Therapie mit einer *in toto* Exzision des betroffenen Lymphknoten mit einer Heilungsrate von 96% vs. 66% im Vergleich zur medikamentösen Therapie mit Clarithromycin und Rifabutin, als überlegen<sup>176</sup>. Eine alleinige Kürettage des betroffenen Lymphknoten zeigte eine signifikant höhere Rate an Wundheilungsstörungen und sollte nur in technisch schwierigen Fällen zur Schonung von Nervenästen des *Nervus facialis* angewandt werden<sup>177</sup>. Eine alleinige medikamentöse Therapie wird hinsichtlich des prolongierten Verlaufs mit Komplikationen, wie Fistelbildung und chronischen Abszessen, sowie dem konsekutiv schlechterem ästhetischen Ergebnis, nicht empfohlen<sup>178,179</sup>. Einige Studien zeigen sogar keinerlei Unterschied zwischen einer medikamentösen Therapie und einer konservativen „wait-and-watch“-Therapie mit alleiniger Observation der Patienten<sup>180,181</sup>.

### **1.7 Zielsetzung**

Die Dringlichkeit einer zügigen und korrekten Diagnosestellung leitet sich aus unterschiedlichen therapeutischen und prognostischen Konsequenzen für die verschiedenen pädiatrischen Ursachen von LAP ab. Speziell die Differentialdiagnostik der mycobakteriellen LAP im Kindesalter stellt aufgrund der unspezifischen Klinik, des langwierigen und schwierigen kulturellen Nachweises, sowie der bislang nur unzureichenden Möglichkeiten einer immunologischen Differenzierung, ein kritisches Problem im klinischen Alltag dar. Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer sensitiven und spezifischen Methode für den immunologischen Nachweis von NTM als Ursache einer LAP unklarer Ätiologie im Kindesalter. Es sollte untersucht werden, ob die komparative Analyse von Zytokinantworten stimulierter T-Zellen auf verschiedene

mycobakterielle Proteinextrakte (PPD) zur immunologischen Identifizierung von NTM beiträgt. Darüber hinaus sollten der Einfluss unterschiedlicher Stimulationsansätze auf die Effektivität der Methode geprüft, sowie neue Zytokine identifiziert werden, welche für weitere immunologische Tests geeignet sein könnten. Dazu wurde ein Studienkollektiv von 25 pädiatrischen Patienten rekrutiert und entsprechend der Ursache ihrer LAP in 3 Gruppen unterteilt. Patienten mit nachgewiesener mycobakterieller Ursache ihrer LAP wurden in die Gruppe „NTM-LAP“ (n=4) eingeordnet. Patienten mit nachgewiesener, nicht-mycobakterieller Ursache ihrer LAP wurden in die Gruppe „Non-NTM-LAP“ (n=8) und Patienten mit LAP unklarer Ätiologie wurden der Gruppe der „Verdachtsfälle“ (n=13) zugeordnet. Den Studienpatienten wurden heparinisierte Vollblutproben entnommen, aus denen mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert wurden. Diese PBMCs wurden sowohl in Kurzzeit-Stimulationsansätzen, als auch in Langzeit-Restimulationsansätzen mit mycobakteriellen PPD *in vitro* inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer nach intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS) auf spezifische Zytokinantworten untersucht. Des Weiteren wurden PBMC-Kulturen und Vollblutproben ebenfalls mit mycobakteriellen PPD *in vitro* inkubiert. Die gewonnenen Überstände wurden mittels CBA und ELISA auf spezifische Zytokinprofile untersucht. Eine Infektion mit *M. tuberculosis* wurde im Vorfeld durch einen *IFN-γ Release Assay* (IGRA) ausgeschlossen.

## 2 MATERIAL & METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Laborgeräte

<b>Laborgerät</b>	<b>Lieferant, Standort</b>
BD FACS Calibur Flusszytometer	BD, Heidelberg
BD FACS Canto II Flusszytometer	BD, Heidelberg
Cryo-Einfriercontainer „Mr. Frosty“	Nalgene, Langenselbold
CO <sub>2</sub> -Inkubator (Brutschrank)	Heraeus, Hanau
Mehrkanalpipetten (30 µl / 300 µl)	Thermo Scientific, Rochester, USA
Mikroskop OLYMPUS CK40	OLYMPUS, Hamburg
Multimode Reader Infinite® M 200	TecanGroup Ltd., Männedorf, Schweiz
Pipetten	Eppendorf, Hamburg Gilson Inc., Middleton, USA Starlab, Hamburg
Pipettierhilfe (PIPETBOY acu)	Integra Biosciences, Fernwald
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Rotixa/RP	Hettich, Mülheim a.d.R.

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Lieferant, Standort</b>
FACS-Röhrchen (5 ml Polystyren)	Sarstedt, Nürnbergrecht
FALCON™-Röhrchen (50 ml)	BD, Heidelberg
Handschuhe, Latex	Sempermed, Wien

Handschuhe, Nitril	Ansell, München
Kanülen	Braun, Melsungen
Kryokonservierungsröhrchen (2 ml)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Neubauer-Zählkammer (0,1 x 0,0025 mm <sup>2</sup> )	Brandt, Wertheim
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Frickenhausen
	Molecular BioProducts, San Diego, USA
	Starlab, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße, Safelock (0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsröhrchen ( <i>Microtubes</i> 1,2 ml)	Starlab, Hamburg
Reaktionsröhrchen – Kappen (8-Strip)	Starlab, Hamburg
Perfusor®-Spritze OPS (50 ml)	Braun, Melsungen
Pipetten Stripette® (5 ml / 10 ml / 25 ml)	Corning Inc., Corning, USA
Spritzen-Sterilfilter ( <i>Millex®-GV-Filter</i> ; 0,22 µm)	Millipore, Cork, Irland
Vacutainer® Lithium-Heparin Plasmaröhrchen (6 ml)	BD, Heidelberg
Zellkulturplatten (Flachboden; 96-Well)	Costar, Corning, USA
Zellkulturplatten (Rundboden; 96-Well)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten-Deckel	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen

### 2.1.3 Chemikalien & Reagenzien

<b>Chemikalie</b>	<b>Lieferant, Standort</b>
AIM V® Kulturmedium	Gibco®, Darmstadt
<i>Aqua destillata</i>	Braun, Melsungen
BD™ CBA 30-Plex Bead Mixture	BD, Heidelberg

Biocoll-Trennlösung (r = 1,077 g/ml)	Biochrom AG, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS)	PAA, Pasching, Österreich
Erythrozyten-Lyse-Puffer	Roche, Mannheim
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA, Pasching, Österreich
Fixationspuffer	BioLegend, Fell
1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
Penicillin/Streptomycin (P/S) (10,000 IU/ml; 10 mg/ml)	PAA, Pasching, Österreich
Permeabilisations-Waschpuffer (10x)	BioLegend, Fell
Propan-1-ol	
Trypanblau Färbung 0,4 %	Gibco®, Darmstadt
Viabilitätsfarbstoff eFluor® 660 (fixierbar)	eBiosciences, San Diego
X-VIVO 15 Medium	LONZA, Köln

Das Fetale Kälberserum wurde für 30 Minuten bei 56°C erhitzt, um Komplementfaktoren zu inaktivieren. Es wurde anschließend steril filtriert und bis zum Gebrauch bei – 20°C gelagert.

#### 2.1.4 Antikörper

Alle Antikörper sind gegen humane Antigene gerichtet und sind in Mäusen generiert worden.

<b>Antikörper</b>	<b>Markierung</b>	<b>Lieferant, Standort</b>
Anti-CD3	PerCP/Cy5.5	BioLegend, Fell
Anti-IFN-γ	PE	BD, Heidelberg
Anti-TNF-α	Alexa Fluor® 488	BioLegend, Fell

### 2.1.5 Stimulantien

Stimulus	End-Konzentration	Lieferant, Standort
Brefeldin A	3,75 µg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dynabeads® Human T-Activator CD3/28	2 x 10 <sup>5</sup> Beads / ml	invitrogen™, Darmstadt
Interleukin-7	10 ng/ml	PeproTech, Hamburg  BioLegend, Fell
Ionomycin	1 µg/ml	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Phorbol-12-Myristat -13-Acetat (PMA)	10 ng/ml	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
PPD Tuberculin	5 µg/ml	Statens Serum Institute, Kopenhagen, Dänemark
PPD Sensitin	5 µg/ml	Statens Serum Institute, Kopenhagen, Dänemark
Staphylokokken Enterotoxin B	2 µg/ml	Ch. Steeg, Berhard Nocht Institut, Hamburg

### 2.1.6 Kits

Kit	Lieferant, Standort
BD™ CBA Human GM-CSF Flex Set (C9)	BD, Heidelberg
BD™ CBA Human IFN-γ Flex Set (E7)	BD, Heidelberg
BD™ CBA Human IL-1α Flex Set (D6)	BD, Heidelberg
BD™ CBA Human IL-9 Flex Set (B7)	BD, Heidelberg
BD™ CBA Human IL-10 Flex Set (B6)	BD, Heidelberg
BD™ CBA Human IL-13 Flex Set (E6)	BD, Heidelberg
BD™ CBA Human IL-21 Flex Set (B8)	BD, Heidelberg
BD™ CBA Human IP-10 Flex Set (B5)	BD, Heidelberg
BD™ CBA Human MIP-1α Flex Set (B9)	BD, Heidelberg
BD™ CBA Human TNF-α Flex Set (C4)	BD, Heidelberg

Human IFN gamma ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience, San Diego, USA
Human IL-13 ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience, San Diego, USA
Human IP-10 Instant ELISA®	eBioscience, San Diego, USA
Human MIP-1α Instant ELISA®	eBioscience, San Diego, USA
Human TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience, San Diego, USA
T-SPOT®.TB-Assay	Oxford Immunotec Ltd., Abingdon, UK

### 2.1.7 Medien & Lösungen

Alle Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem oder doppelt-distilliertem Wasser angesetzt. Alle hitzeempfindlichen Medien wurden über einen 0,22µm Sterilfilter filtriert. Alle hitzeunempfindlichen Lösungen wurden für 20 Minuten bei 135°C und 2 bar autoklaviert.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bestandteile</b>	<b>Endkonzentration</b>
10 % FKS in PBS	FKS D-PBS	10 % ad
Einfriermedium	DMSO FKS X-VIVO + P/S	20 % 20 % ad
X-VIVO + P/S	Penicillin Streptomycin X-VIVO 15	1 % 1 % ad
1 x Permeabilisations- Waschpuffer	10 x Permeabilisations- Waschpuffer H <sub>2</sub> O	10 % ad

### 2.1.9 Spenderzellen

Die Durchführung der Experimente erfolgte mit, aus Vollblut isolierten, humanen peripheren mononukleären Zellen (PBMC) oder direkt mit Vollblut. Das Material wurde als 1-6 ml Aliquot im Rahmen von Routineblutabnahmen aus dem Patientenkollektiv der Klinik für Allgemeinen Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie der Universitätsklinik Düsseldorf gewonnen. Die Spender waren im Alter zwischen 0-18

Jahren und die schriftliche Einwilligung durch den gesetzlichen Vertreter lag, nach ausführlicher Aufklärung, stets vor.

### 2.1.10 Software

<b>Software</b>	<b>Lieferant, Standort</b>
BD CellQuest	BD, Heidelberg
BD FACSDiva v6.0	BD, Heidelberg
FCS Express v4	deNovo Software, Los Angeles, USA
FCAP Array Analysis Software v3	Soft Flow Inc., St Louis Park, USA
GraphPad Prism v6	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Magellan™ <i>Data Analysis Software</i>	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Microsoft Excel for Mac 2011	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Power Point for Mac 2011	Microsoft Corporation, USA

## 2.2 METHODEN

### 2.2.1 Einteilung der Studienteilnehmer

Alle Studienteilnehmer wurden über die Ambulanzen und Stationen der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf akquiriert. Es wurden insgesamt 25 Kinder im Alter von 0-18 Jahren in die Studie einbezogen. Es galten folgende Einschlusskriterien für die Studie:

- Kinder mit einer LAP, die unbehandelt oder unter adäquater Therapie, seit mindestens 7 Tagen oder länger persistiert und bei denen eine mycobakterielle Infektion als Differentialdiagnose in Frage kommt.

Bei allen Kindern wurde ein *Interferon-gamma-release Assay* (IGRA; T-SPOT.TB®-Assay von Oxford Immunotec Ltd.) zum Ausschluss einer Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) durchgeführt. Das positive Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf lag zu Beginn der Studie vor (interne Studiennummer: 3824 – März 2012). Die Studienteilnehmer wurden anhand von Anamnese, klinischem Bild, THT nach Mendel-Mantoux, histopathologischen, kulturellen und/oder molekular-biologischen Verfahren (via PCR) in 3 Gruppen unterteilt (s. Tab. 2.1 & 2.2). Patienten mit einer bestätigten Infektion mit nicht-tuberkulösen Mycobakterien (NTM) als Ursache der LAP, wurden in die Gruppe „NTM“ eingeteilt. Patienten mit einer bestätigten nicht-mycobakteriellen Ursache einer LAP, wurden in die Gruppe der „Negativkontrollen“ eingeteilt. Patienten, bei denen die Ätiologie der LAP während des Studienverlaufs ungeklärt blieb wurden in die Gruppe der „Verdachtsfälle“ sortiert.

**Tabelle 2.1 – Demographische Daten der Patienten eingeteilt in einzelne Studiengruppen bzgl. Alter Geschlechterverteilung und BCG-Impfstatus**

	NTM	Negativkontrollen	Verdachtsfälle
n (% von Gesamt)	4 (16)	8 (32)	13 (52)
Alter in Jahren ± SD (Median)	4,1±2,7 (3,5)	5,4±4,9 (4)	5,2±5,0 (4)
Alter < 5 Jahren, n (%)	2 (50)	5 (63)	8 (62)
Männlich, n (%)	2 (50)	5 (63)	10 (77)
BCG geimpft, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

**Tabelle 2.2 – Klinische Charakteristika der Patienten und durchgeführte Untersuchungen**

Patient	Alter	Geschlecht	Initiale Diagnose	THT <sup>a</sup>	IGRA <sup>b</sup> (T-SPOT.TB®)	Histopathologie/Mikroskopie	Tbc-PCR <sup>c</sup>	Kultur
A	5 Jahre	♀	zervikale LAP*, links/NTM-Infektion**	ND	nicht reaktiv <sup>d</sup>	Granulome mit zentral-verkäasenden Nekrosen, kein Nachweis säurefester Stäbchen	positiv für MAI <sup>f</sup>	positiv für MAI <sup>f</sup>
B	8 Jahre	♂	submandibuläre/zervikale LAP*, rechts/Lymphadenitis durch NTM*-Infektion	ND	ND	granulomatöse Veränderungen, kein Nachweis säurefester Stäbchen	negativ	positiv für <i>Mycobacterium malmoense</i>
C	2 Jahre	♂	bilaterale zervikale Lymphadenitis	negativ	nicht reaktiv <sup>d</sup>	Granulome mit zentral-verkäasenden Nekrosen, kein Nachweis säurefester Stäbchen	negativ	positiv für MAI <sup>f</sup>
D	15 Monate	♀	chronische submandibuläre Lymphadenitis/LAP*, links	positiv (Induration: 13 mm)	nicht reaktiv	Granulome mit zentral-verkäasenden Nekrosen, kein Nachweis säurefester Stäbchen	negativ	positiv für MAI <sup>f</sup>
E	14 Jahre	♀	bilaterale zervikale LAP*	ND	nicht reaktiv <sup>d</sup>	anaplastisch-großzelliges T-Zell-Lymphom	ND	ND
F	12 Jahre	♂	bihilare LAP*/Sarkoidose	negativ	nicht reaktiv	ND	negativ	ND
G	3 Monate	♂	zervikale LAP*	negativ	nicht reaktiv <sup>d</sup>	kein Nachweis säurefester Stäbchen	negativ	Nachweis von MSSA <sup>g</sup>
H	7 Jahre	♀	okzipitaler Abzess/Lymphadenitis	negativ	nicht reaktiv	kein Nachweis säurefester Stäbchen	ND	Nachweis von MSSA <sup>g</sup>
I	4 Jahre	♂	zervikale & mediastinale LAP*	ND	nicht reaktiv <sup>d</sup>	Hodgkin Lymphom	ND	negative
J	1 Monat	♂	zervikale Lymphadenitis, links	negativ	ND	kein Nachweis säurefester Stäbchen	ND	Nachweis von MSSA <sup>g</sup>
K	4 Jahre	♂	zervikale LAP*, links	ND	nicht reaktiv <sup>d</sup>	Hodgkin Lymphom	ND	ND
L	2 Jahre	♀	submentale LAP*/Lymphadenitis	negativ	ND	ND	ND	Nachweis von MSSA <sup>g</sup>
M	2 Jahre	♀	zervikale LAP*	ND	nicht reaktiv <sup>d</sup>	kein Nachweis säurefester Stäbchen	ND	negativ
N	18 Jahre	♂	mediastinale Raumforderung/ LAP*	ND	nicht reaktiv	kein Nachweis säurefester Stäbchen	negativ	negativ
O	9 Jahre	♂	zervikale Lymphadenitis, links	ND	nicht reaktiv <sup>d</sup>	ND	ND	ND
P	4 Jahre	♂	bilaterale cervical LAP*	ND	nicht reaktiv <sup>d</sup>	ND	ND	ND
Q	10 Monate	♂	bilaterale zervikale Lymphadenitis	negativ	nicht reaktiv <sup>d</sup>	ND	ND	ND
R	23 Monate	♀	submentale LAP*	ND	nicht reaktiv <sup>d</sup>	ND	ND	ND
S	4 Jahre	♂	chronische bilaterale zervikale LAP*	ND	nicht reaktiv <sup>d</sup>	ND	ND	ND
T	5 Jahre	♂	bilaterale zervikale LAP*/Lymphadenitis	ND	nicht reaktiv <sup>d</sup>	ND	ND	ND
U	12 Jahre	♂	chronisch bilaterale zervikale LAP*	negativ	nicht reaktiv	ND	ND	ND
V	7 Jahre	♂	chronisch bilaterale submandibuläre/zervikale LAP*	ND	nicht reaktiv <sup>d</sup>	ND	ND	ND
W	13 Monate	♂	chronische bilaterale zervikal LAP*	negativ	ND	kein Nachweis säurefester Stäbchen <sup>h</sup>	negativ <sup>h</sup>	negativ <sup>h</sup>
X	19 Monate	♂	Zervikale LAP*	negativ	ND	ND	ND	ND
Y	11 Monate	♂	zervikale LAP*	ND	nicht reaktiv <sup>d</sup>	ND	ND	ND

\*: Lymphadenopathie  
 \*\*: Nicht-Tuberkulöse Mycobakterien  
 ND: Nicht durchgeführt

a: Tuberculin Haut Test (RT23)

b: Interferon-gamma Release Assay

c: Polymerase Chain Reaction auf *Mycobacterium tuberculosis* Gensequenzen

d: Test wurde mit kryo-konvertierten peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) durchgeführt

f: *Mycobacterium avium/intracellulare* Komplex

g: Methicillin-sensibler *Staphylococcus aureus*

h: Test mit Magensaft durchgeführt

i: Tuberkulose

## 2.2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Kurzzeit-Stimulation im Vollblut

Für die Generierung von Serumüberständen für Zytokinbestimmungen aus dem Vollblut wurden pro Well 100µl Vollblut 1 : 1 mit D-PBS verdünnt und auf eine 96-Well - Zellkulturplatte gegeben. Zwecks Sensitivitätssteigerung des Assays wurde der Kultur Interleukin-7 (IL-7) hinzugefügt. Feske *et al.* konnten zeigen, dass IL-7 zu einer signifikanten Steigerung der IFN-γ-Detektion in ELISA und ELISPOT-Assays führt. In Abwesenheit eines stimulierenden Antigens zeigt IL-7 einen vernachlässigbar kleinen zytokin-induzierenden Effekt<sup>182</sup>. Zu jedem Well wurden 0,2µl IL-7 gegeben, um eine Endkonzentration von 10 ng/ml zu erzielen. Anschließend wurden die Wells mit den entsprechenden Stimuli versetzt und für 16-20 Std. im Brutschrank bei 37°C + 5% CO<sub>2</sub>

inkubiert. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich ein unstimulierter Ansatz angelegt. Nach beendeter Inkubationszeit wurden pro Well ca. 150µl des Serum-Überstands geerntet und bei - 20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

<b>Stimulus</b>	<b>Endkonzentration</b>
Dynabeads® Human T-Activator CD3/28	2 x 10 <sup>5</sup> Beads /ml
IL-7	10 ng/ml
PPD Tuberculin	5 µg/ml
PPD Sensitin	5 µg/ml
Staphylokokken Enterotoxin B	2 µg/ml

### **2.2.2.2 Isolierung von PBMCs aus dem Vollblut**

Die peripheren mononukleären Zellen (PMBC) wurden durch eine Ficoll®-Dichtegradientenzentrifugation (Biocoll, Biochrom AG) aus 1-6 ml heparinisiertem Vollblut aufgetrennt und isoliert. Die ersten Schritte der Isolierung fanden bei Raumtemperatur statt. Das heparinisierte Vollblut wurde im Verhältnis 1:1 mit D-PBS verdünnt und vorsichtig auf 15 ml Ficoll®-Lösung geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 1600 rpm für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Akzeleration und Dezeleration der Zentrifuge wurden für diesen Schritt auf die Minimaleinstellung gesetzt. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Lymphozyten, die nach der Zentrifugation als weißlicher Ring zwischen dem Plasma und der Ficoll®-Lösung zum Liegen kommen, wurden vorsichtig entnommen und in ein neues Röhrchen überführt. Die Lymphozytensuspension wurde dann mit eiskaltem D-PBS 1:1 verdünnt und bei 4°C mit 1200 rpm für 25 Minuten, diesmal mit maximaler Ak- und Dezeleration, zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das entstandene Pellet vorsichtig ohne Schaumbildung in 1 ml kaltem D-PBS resuspendiert. Nach der Zugabe von weiteren 10 ml D-PBS wurden die Zellen ein weiteres Mal bei 1200 rpm, bei 4°C für 12 Minuten zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet für die anschließende Zellzahlbestimmung in 1 ml X-VIVO + P/S-Medium resuspendiert.

### 2.2.2.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl der Lymphozytensuspension wurde ein repräsentatives Volumen der Zellen mit Trypanblau-Lösung gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Beim Trypanblau handelt es sich um einen anionischen Diazofarbstoff, welcher direkt an zelluläre Proteine bindet, sobald der Farbstoff die Zellmembran überschreitet. Aufgrund einer intakten Zellmembran werden lebendige Zellen nicht durch den Farbstoff markiert, während tote Zellen sich tiefblau anfärben. Es wurden 10 µl einer 1:40-Verdünnung der Zellsuspension in Trypanblau-Lösung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und mit einer 10 x Vergrößerung ausgezählt. Die Zellzahl ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{Gezählte Zellen auf 4 Quadranten} \times 10^5 = \text{Zellzahl/ml}$$

### 2.2.2.4 Kurzzeitstimulation & Langzeit-Restimulation von isolierten PBMCs

Für die Messung von intrazellulären Zytokinen (*Intracellular cytokine staining*; ICS), sowie für die Generierung von Zellkulturüberständen zur Zytokinbestimmung wurden PBMCs aus den Vollblutproben isoliert und gezählt, wie bereits in 2.2.2.1-2 beschrieben. Für die Kurzzeit-Stimulationsansätze wurden je  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well in 200µl X-VIVO + P/S-Medium aufgenommen und auf eine 96-Well Zellkulturplatte gegeben. Für die Langzeit-Restimulation wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well in 200µl X-VIVO + P/S-Medium eingesetzt. Die Ansätze wurden stets doppelt angesetzt, um sowohl Zellen für die ICS, als auch für die Generierung von Zellkulturüberständen bereit zu stellen. Jedes Well erhielt 0,2µl Interleukin-7, um eine Endkonzentration von 10 ng/ml zu erzielen. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden Stimuli versetzt, wobei bei den Ansätzen für die Langzeit-Stimulation auf PMA/Ionomycin als Stimulus verzichtet wurde.

<b>Stimulus</b>	<b>Endkonzentration</b>
Dynabeads® Human T-Activator CD3/28	2 x 10 <sup>5</sup> Beads /ml
IL-7	10 ng/ml
Ionomycin	1 µg/ml
Phorbol-12-Myristat -13-Acetat (PMA)	10 ng/ml
PPD Tuberculin	5 µg/ml
PPD Sensitin	5 µg/ml

Als Negativkontrolle diente ein Well ohne Stimulus. Für die Kurzzeit-Stimulation folgte direkt die Zugabe von 0,75µl Brefeldin A in die Wells für die ICS, um eine Zytokinausschüttung in das Medium zu verhindern. Bei Brefeldin A handelt es sich um einen Hemmstoff der intrazellulären Translokation von Transport-Vesikeln. Durch die Inhibition der Vesikeltranslokation auf der Ebene vom Endoplasmatischem Retikulum und Golgi Apparat, kommt es konsekutiv zu einer intrazellulären Akkumulation von Exportproteinen, welche so intrazellulär nachweisbar werden<sup>183</sup>. Nach einer Inkubation bei 37°C + 5% CO<sub>2</sub> für 16-20 Stunden wurde der Zellkulturüberstand aus den entsprechenden Wells geerntet und bei - 20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die ICS-Wells folgten die Viabilitätsfärbung (2.2.2.8), Permeabilisation und Fixation (2.2.2.10) nach Protokoll für die anschließende durchfluss-zytometrische Analyse. Die Ansätze für die Langzeit-Stimulation wurden nach Zugabe der o.g. Stimuli zunächst ohne Brefeldin A für 6 Tage bei 37°C + 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. An Tag 6 folgte dann die Restimulation mit denselben Stimuli und die Zugabe von Brefeldin A, bevor nochmals für 16-20 Stunden inkubiert wurde. Diverse Studien konnten zeigen, dass eine solche zweizeitige Stimulation zu einer verstärkten T-Zell-abhängigen Zytokinexpression führt.<sup>184-186</sup> Nach abgelaufener Inkubationszeit erfolgten die Viabilitätsfärbung (2.2.2.8), Permeabilisation und Fixation (2.2.2.10) wie nach der Kurzzeit-Stimulation.

### **2.2.2.5 Viabilitätsfärbung**

Bei der Vorbereitung für den intrazellulären Nachweis von Zytokinen wurde zunächst eine Viabilitätsfärbung der Zellen vorgenommen, um die Möglichkeit zu erhalten, während der durchfluss-zytometrischen Untersuchung avitale von vitalen Zellen zu

unterscheiden. Durch den Farbstoff werden speziell avitale Zellen und Zelltrümmer markiert und im Durchflusszytometer erkennbar. Dazu wurden die Zellkulturplatten nach Ablauf der Inkubationszeit bei 1500 rpm bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgeworfen. Dann wurden 1µl einer 1 : 100-Verdünnung des Viabilitätsfarbstoffes eFluor 660 (eBioscience) in das Residualvolumen jedes Wells gegeben und kräftig resuspendiert. Es folgte eine lichtgeschützte Inkubation von 30 Minuten auf Eis. Anschließend wurden 180 µl kaltes D-PBS pro Well hinzugegeben und die Platte erneut bei 1500 rpm bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abwurf des Überstands wurde der Waschschrift nochmals wiederholt. . Nach dem letzten Abwerfen des Überstandes wurde direkt mit der Fixation und Permeabilisierung der Zellen fortgefahren (siehe 2.2.2.9).

#### **2.2.2.6 Fixation & Permeabilisierung der Zellen**

Um eine Stabilisierung der Membran- und Antigenverhältnisse der Zelle, sowie eine Desintegration während des Permeabilisationsvorgangs zu verhindern, mussten die Zellen in einer paraformaldehyd-haltigen Lösung fixiert werden. Die Permeabilisierung der Zellen durch saponin-haltige Lösungen ist die Voraussetzung, um Antikörperfärbungen von intrazellulären Strukturen und Zytokinen durchführen zu können. Zur Fixation der Zellen wurden 100µl des Fixationspuffer (BioLegend) in jedes Well hinzugegeben und kräftig resuspendiert, um Verklumpungen der Zellen zu verhindern. Es folgte eine Inkubation unter Lichtausschluss auf Eis für 30 Minuten. Nach abgelaufener Inkubationszeit erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 1x-konzentriertem Permeabilisations-Wasch-Puffer (BioLegend). Dazu wurde die Zellkulturplatte bei 1700 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgeworfen. Anschließend wurden 180µl des Permeabilisations-Wasch-Puffers zu jedem Welle hinzugegeben und nochmals bei 1700 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach Abwurf des Überstandes, wurde der oben beschriebene Waschschrift ein weiteres Mal wiederholt.

### 2.2.2.7 Antikörperfärbung der Zellen

Für die durchflusszytometrische Analyse der Zellen und ihrer Zytokine müssen diese mit spezifischen fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt werden. Um eine Färbung der intrazellulär gespeicherten Zytokine möglich zu machen, müssen die Zellen, wie in 2.2.2.10 beschrieben zunächst fixiert und permeabilisiert werden (*intracellular cytokine staining* – ICS). Um eine Unterscheidung von toten und vitalen Zellen im Durchflusszytometer möglich zu machen, wurde vor der Fixierung eine Viabilitätsfärbung nach 2.2.2.8 durchgeführt. Die fixierten und permeabilisierten Zellen werden direkt nach dem letzten Waschschrift im Residualvolumen ihrer Wells gefärbt. Die in Tabelle 2.3 aufgeführten Antikörper zur Färbung der Zytokine und Oberflächenmoleküle wurden in jedes Well gegeben und sorgfältig resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen 2-mal in 180µl 1 x Permeabilisations-Waschpuffer gewaschen und in 150µl PBS für die Messung am Durchflusszytometer aufgenommen.

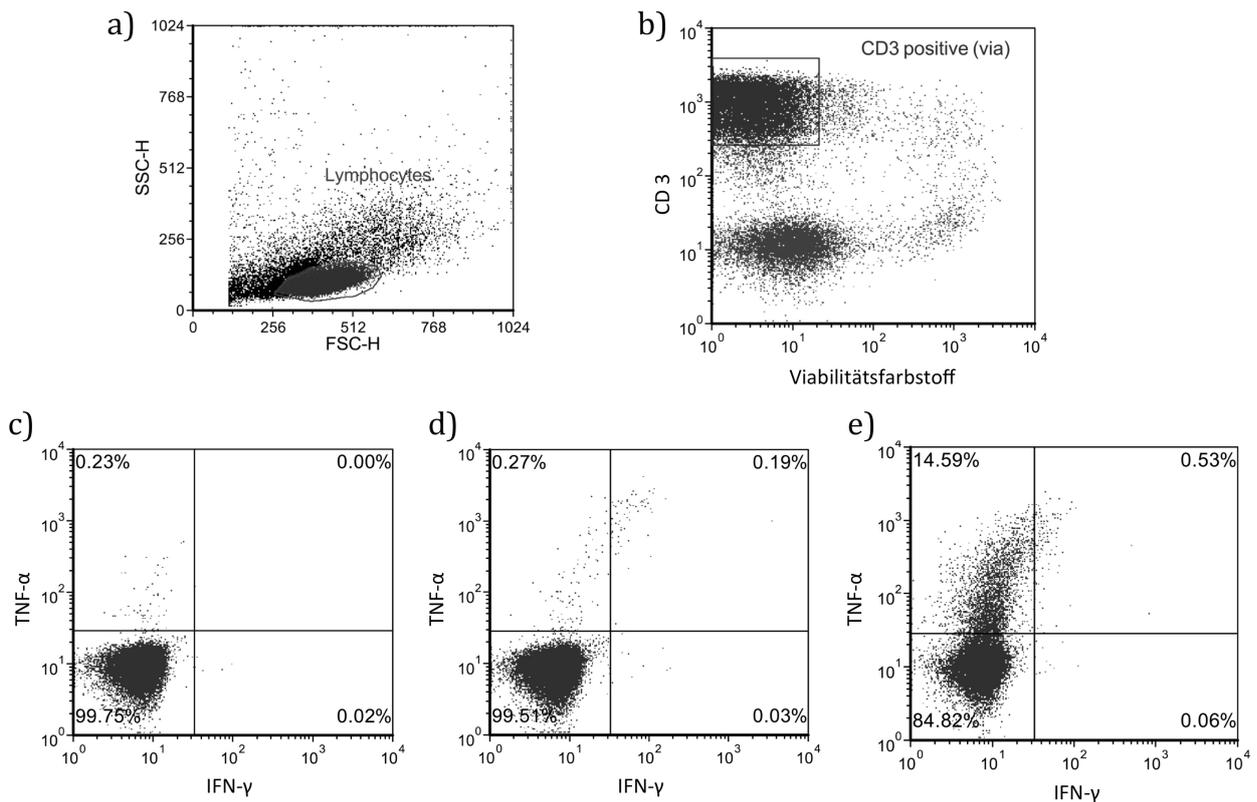
**Tabelle 2.3 – Liste der verwendeten Antikörper mit ihren gekoppelten Konjugaten, Einsatzmenge und Zielmolekülen**

Zytokin	Oberflächenmarker	Konjugat	Einsatzmenge/ Well
IFN- $\gamma$		PE	0,5 µl
TNF- $\alpha$		AlexaFluor® 488	0,5 µl
	CD 3	PerCP-Cy5.5	0,05 µl

### 2.2.2.8 Durchfluss-zytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie ist eine laser-basierte, bio-physikalische Methode für die Analyse von Partikel- oder Zellsuspensionen. Durch sogenannte hydrodynamische Fokussierung in einem Hüllstrom aus Trägerflüssigkeit werden die Zellen zu einem Strom gebündelt und einzeln durch eine Messzelle mit einer Reihe von Lasern und Detektoren geleitet. So können sehr hohe Zellzahlen in kurzer Zeit (bis zu 1000 Zellen/ Sekunde) analysiert und charakterisiert werden. In seiner einfachsten Ausführung misst die Methode die Größe und Granularität der Zellen anhand des Streulichts der Laser, wenn diese auf die Zellen treffen. Durch die Beugung des Lichts in einem flachen Winkel entsteht das sogenannte Vorwärtsstreulicht oder *forward scatter* (FSC), welches vom Volumen der Zelle abhängt. Die Brechung des Lichts im rechten Winkel kommt im Seitwärtsstreulicht oder *side scatter* (SSC) zum Ausdruck, welches von der Granularität

der Zelle, Größe von Zellkernen und Dichte von intrazellulären Vesikeln abhängt. Um die Zellen durch bestimmte Oberflächenmarker besser zu unterscheiden oder die Präsenz oder Produktion von bestimmten intrazellulären Proteinen genauer beurteilen zu können, besteht die Möglichkeit hoch-spezifische, fluoreszenz-markierte Antikörper einzusetzen mit denen die Zellen vor der Analyse inkubiert werden (2.2.2.11). Das Gerät ist in der Lage durch seine Laser diese Fluoreszenzmarkierungen anzuregen und die entsprechenden Emissionen mit verschiedenen Wellenlängen zu detektieren. Durch den Einsatz von verschiedenen Antikörpern ist so auch die simultane Erfassung von mehreren Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen möglich. Für unsere Versuche erfolgte eine Antikörper-Färbung für den Oberflächenmarker CD3, sowie die Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , wie in Kapitel 2.2.2.10 bereits beschrieben. Die Messungen erfolgten an einem BD™FACSCalibur und die Daten wurden mithilfe der Analyse- Software FCS Express v4.0 (deNovo Software) ausgewertet. In Abbildung 2.1 ist exemplarisch die durchfluss-zytometrische Analyse der Zellen und entsprechender intrazellulärer Zytokine zu sehen. Das technische Detektionslimit für Zellen in der Software, sowie für das Gerät liegt bei 0,01%. Durch arbeitsgruppen-interne Vorversuche wurde 0,03% IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  doppelt-positive Zellen im entsprechendem Gate als spezifische Antwort festgelegt. Die Bedeutung von multifunktionalen T-Zellpopulationen als Ausdruck einer effektiven T<sub>H</sub>1-Zellantwort gegenüber Pathogenen konnte in diversen Arbeiten gezeigt werden<sup>104-106</sup>.



**Abb. 2.1) – Exemplarische Darstellung der Analysestrategie für zytokin-produzierende, vitale T-Zellen nach 16-20 Stunden *in vitro* Stimulation in isolierten PBMCs**

a) zeigt die Verteilung der Zellen im Vorwärts- (FSC-H) und Seitwärtsstreulicht (SSC-H) mit einem Analysefenster (grauer Kreis/Gate) um die Lymphozyten. b) zeigt die Zellen aus dem Analysefenster in a), aufgetrennt nach ihrer Viabilität (X-Achse) und nach dem Oberflächenmarker CD 3 (Y-Achse). Das quadratische Analysefenster zeigt viable, CD 3-postiven Lymphozyten. Die unteren drei Abbildungen zeigen die T-Lymphozyten c) ohne Zugabe von Stimulus, d) mit Zugabe von PPD Sensitin und e) mit Zugabe von CD3/28-Dynabeads®, aufgetrennt nach ihrer IFN- $\gamma$  (X-Achse) bzw. TNF- $\alpha$  (Y-Achse) Produktion. Diese Analysestrategie ist repräsentativ für alle durchgeführten durchflusszytometrischen Experimente.

### 2.2.2.9 Kryo-Konservierung von PBMCs

Zellen, welche nicht direkt für die Stimulationsversuche (s. 2.2.2.6 – 7) verwendet wurden, wurden zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff (Kryokonservierung) aufbewahrt. Dazu wurden die isolierten PBMCs in einem Einfriermedium aus Dimethylsulfoxid (DMSO; 20%), fetalem Kälberserum (FKS; 20%) und X-VIVO + P/S (ad) eingefroren. Das DMSO verhindert als „Gefrierschutzmittel“ eine Kristallbildung in und um die Zellen herum und beugt Schädigungen und vermehrtes Absterben der Zellen, während des Gefrierprozesses vor. Die PBMCs wurden mit 1200 rpm für 7 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet wurde in 500  $\mu$ l X-

VIVO + P/S resuspendiert. Die 500µl Zellsuspension wurden dann komplett in ein Einfrierröhrchen überführt, um anschließend 500µl des Einfriermediums hinzu zu träufeln und das Röhrchen sehr zügig in einem Cryo-Einfriercontainer bei - 80°C einzufrieren. Der Cryo-Einfriercontainer wurde vorher mit Propan-1-ol befüllt und auf 0° bis - 5°C vorgekühlt, um einen optimalen Temperaturabfall der Zellsuspension von 1-3°C pro Stunde zu gewährleisten. Zur Langzeitlagerung wurden die die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

### **2.2.2.10 Auftauen von kryo-konservierten PBMCs**

Die gefrorenen Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut bis der Durchmesser des gefrorenen Anteils ungefähr 5 mm betrug. Es wurde dann 1 ml 10% FKS/PBS-Lösung hinzugefügt, um anschließend die gesamte Suspension in 9 ml 10% FKS/PBS zu überführen. Die Zellen wurden dann bei 4°C mit 1200 rpm für 12 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml X-VIVO + P/S Medium resuspendiert. Die Zählung der Zellen wurde durchgeführt, wie in 2.2.2.2 beschrieben.

### **2.2.2.11 T-SPOT®.TB-Assay**

#### **2.2.2.11.1 Durchführung**

Der T-SPOT®.TB-Assay (Oxford Immunotec) wird im Rahmen der immunologischen Routinediagnostik bei Verdacht auf mycobakterielle Infektion im Institut für Medizinische Mikrobiologie & Krankenhaushygiene der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt. Für alle Patienten bei denen der Assay nicht im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführt wurde, wurde der Test mit aufgetauten kryo-konservierten Zellen (s. 2.2.2.4) nachgeholt. Die benötigten PBMCs wurden, wie in 2.2.2.1-2 beschrieben, aus dem Vollblut isoliert und gezählt. Das Assay wurde nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt und ausgewertet.

Es wurden 500µl einer Zellsuspension mit einer Konzentration von  $2,5 \times 10^5$  lebende Zellen/ 100µl hergestellt. In das Well für die Nullkontrolle wurden 50µl AIM V®-Kulturmedium gegeben. In das Well für die Positivkontrolle wurden 50µl Phytohämagglutinin (PHA). In die beiden verbleibenden Wells wurden je 50µl der entsprechenden Testlösungen (Panel A: ESAT-6; Panel B: CFP-10) pipettiert. Anschließend wurden in jedes Well 100µl der Zellsuspension ( $2,5 \times 10^5$  Zellen) gegeben.

Die Zellen wurden dann für 16-20 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde der Überstand abgegossen. Anschließend wurden die Wells mit je 200µl sterilem PBS 3x gewaschen. Das mitgelieferte Konzentrat der Konjugat-Reagenz (gegen IFN-γ gerichtete, monoklonale murine Antikörper konjugiert mit dem Enzym Alkalische Phosphatase) wurde in sterilem PBS verdünnt und auf Raumtemperatur gebracht. Jedes Well wurde mit 50µl der verdünnten Konjugat-Reagenzlösung versehen und für eine Stunde bei 2-8°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden 50µl der mitgelieferten NBT/BCIP (*Nitro-Blue Tetrazolium / 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphat p-Toluidin-Salz*) Substrat-Lösung pro Well hinzugegeben und für weitere 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Reaktion in den Wells durch die Hinzugabe und das Waschen mit destilliertem Wasser gestoppt. Die Well-Platten wurden vor dem Auslesen bei Raumtemperatur getrocknet.

#### **2.2.2.11.2 Auswertung**

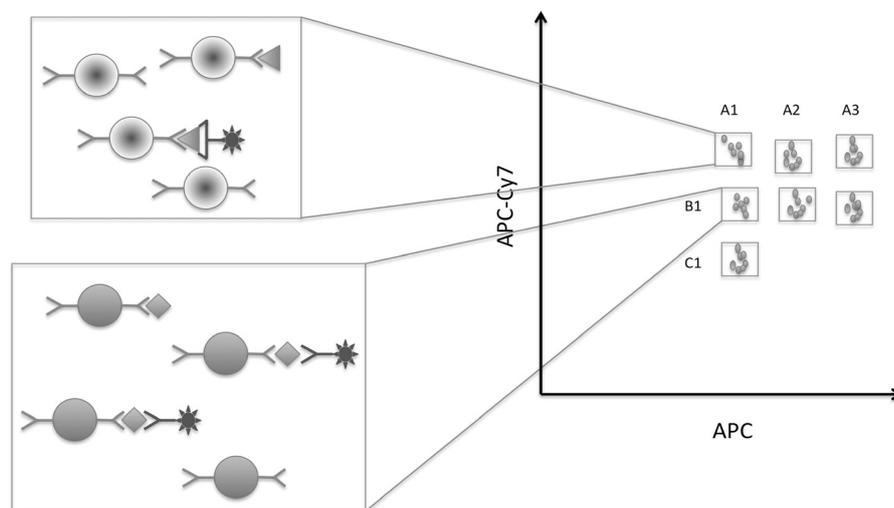
Der Test wurde als positiv gewertet, wenn Panel A und/oder B mindestens 8 Spots oder mehr als das Well der Nullkontrolle aufwies, sofern die Nullkontrolle  $\leq 10$  Spots aufwies. Finden sich in Panel A und/oder B nur 5-7 Spots mehr als im Vergleich zur Nullkontrolle, gilt der Test als indifferent und sollte wiederholt werden. Finden sich  $>10$  Spots in der Nullkontrolle gilt der Test als ungültig und sollte ebenfalls wiederholt werden. Der Test gilt als negativ, wenn sich in Panel A und B  $\leq 4$  Spots finden, sofern das Well mit der Positivkontrolle  $\geq 20$  Spots zeigt bzw. gesättigt (einzelne Spots nicht auszählbar durch hohe Anzahl) ist. Weist das Well mit der Positivkontrolle  $<20$  Spots auf und  $\leq 4$  Spots in Panel A und B als in der Nullkontrolle, gilt der Test als ungültig und sollte wiederholt werden.

#### **2.2.2.12 Zytokin-Messung aus Zellkulturüberständen und Serum**

##### **2.2.2.12.1 Messung mit Cytometric Bead Array® (CBA)**

Beim CBA handelt sich um eine kombinierte Methode aus Durchflusszytometrie und einem Immun-Assay, die es ermöglicht multiple Biomarker, wie beispielsweise Zytokine und zahlreiche weitere Proteine simultan aus einer einzigen Probe qualitativ und semi-quantitativ zu untersuchen. Kernstück dieser Methode sind dabei die sogenannten *Beads* – mikroskopische Polystyrolkugeln – welche durch Größe und individuelle

Verhältnisunterschiede in der Intensität von zwei Fluoreszenzfarbstoffen (APC-Cy7 + APC) auf Ihrer Oberfläche in mehr als 30 verschiedene Populationen mit alpha-numerischer Kennung unterteilt und klar im Durchflusszytometer unterschieden werden können. Wie in Abbildung 2 dargestellt sind die *Beads* mit spezifischen Antikörpern konjugiert, welche eine hohe Affinität zu Ihrem Substrat aufweisen und entsprechend spezifisch binden (sog. *Capture Beads*). In einem zweiten Schritt werden freie Detektions-Antikörper mit derselben Substratspezifität hinzugegeben, welche mit einem weiteren Fluoreszenzfarbstoff (PE) konjugiert sind. Die Intensität dieses zweiten Fluoreszenzmarkers im Durchflusszytometer ist somit direkt abhängig von der Menge an gebundenem Substrat pro *Bead* und damit proportional zur Konzentration des Substrats in der Probe. Jedes Kit enthält das entsprechende Paar an substrat-spezifischen *Beads* und Detektions-Antikörper. Somit ist es möglich in selbst geringen Probemengen durch die Inkubation mit mehreren *Bead*-Antikörper-Paaren gleichzeitig mehrere Substrate nachzuweisen und zu messen. Um letztlich von der Fluoreszenz-Intensität auf die Konzentration des Substrats in der Probe schließen zu können, werden Standardkurven von Verdünnungsreihen mit bekannten Konzentrationen heran gezogen.



**Abb. 2.2) – Schematische Darstellung zum Prinzip des Cytometric Bead Array® (CBA)**

Mikroskopische Polystyrol-Kugeln (sog. *Beads*) sind mit hoch-affinen Antikörpern konjugiert, die ihre Substrate spezifisch binden. Die entsprechenden substratspezifischen Detektions-Antikörper sind mit dem Farbstoff PE konjugiert, welches als Signal im Durchflusszytometer detektiert werden kann. Die einzelnen *Bead*-Populationen können durch unterschiedliche Fluoreszenzverhältnisse der Farbstoffe APC und APC-Cy7 im Durchflusszytometer unterschieden werden.

Für die durchgeführten Analysen wurden BD™CBA Flex Sets eingesetzt. Bei den Proben handelte es sich um Serum und Zellkulturüberstände, welche in den Stimulationsversuchen aus Vollblut und isolierten PBMCs gewonnen wurden (2.2.2.6-7).

Die Proben wurden zunächst auf insgesamt 10 verschiedene Zytokine (Tab. 2.3) untersucht.

**Tabelle 2.4 – Liste der untersuchten Zytokine mit den BD™CBA Flex Sets**

GM-CSF	IL-13
IFN- $\gamma$	IL-21
IL-1 $\alpha$	IP-10
IL-9	MIP-1 $\alpha$
IL-10	TNF $\alpha$

Nachdem alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht wurden, wurde die Standard-Verdünnungsreihe hergestellt. Die, jeweils in den Kits enthaltenen, lyophilisierten Standardkugeln wurden in 4 ml sterilem PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Lösung gebracht. Für die Verdünnungsreihe wurden jeweils 100 $\mu$ l steriles PBS in 8 beschriftete Eppendorf-Reaktionsgefäße vorgelegt. Dann wurden 100 $\mu$ l aus der Top Standard-Lösung in das erste Gefäß gegeben und gemischt. Die restliche Verdünnungsreihe wurde ebenfalls mit jeweils 100 $\mu$ l aus dem Vor-Gefäß seriell, 1:1 fortgeführt bis die in Tabelle 2.4 dargestellten Verdünnungen bzw. Konzentrationen erreicht wurden. Zwei weitere Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden mit 100  $\mu$ l aus der Top Standard-Lösung bzw. mit 100 $\mu$ l sterilem PBS gefüllt und als Top Standard bzw. als Negativkontrolle gekennzeichnet.

**Tabelle 2.5 – Verdünnungsreihe mit den Proteinkonzentrationen der Standardkurve für den CBA**

	Verdünnung								
	Top Standard	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
<b>Protein (pg/ml)</b>	2.500	1.250	625	312,5	156	80	40	20	10

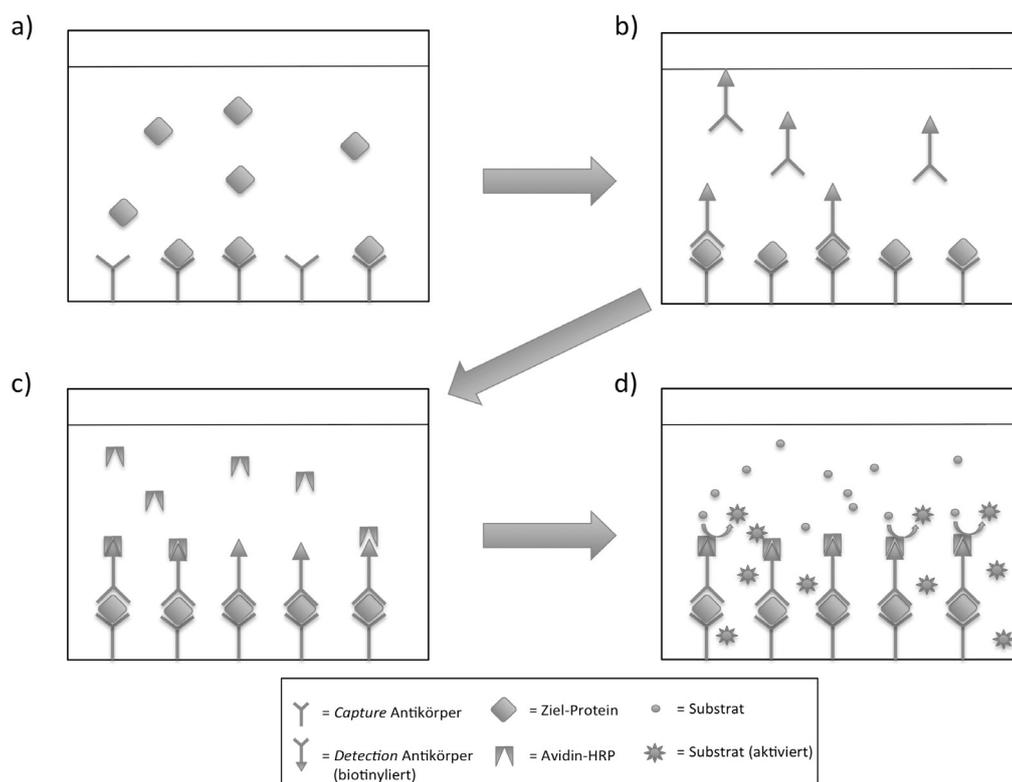
Die Inkubation der Proben mit *Capture Beads* und Detektions-Antikörpern wurde in 96-Well Zellkulturplatten durchgeführt. Zur Vorbereitung des *Capture Bead*-Gemisches wurden die einzelnen *Bead*-Stammlösungen für mindestens 30-60 Sekunden gemischt, um Klumpenbildung zu vermeiden. Das *Bead*-Gemisch sollte für jedes Well 1 $\mu$ l der zytokin-spezifischen *Capture Beads* pro zu testenden Zytokin bei einem Gesamtvolumen von 50 $\mu$ l pro Well enthalten. Um die Verdünnung für das nötige Gesamtvolumen zu erreichen, wurde steriles PBS verwendet.

Die Proben aus den Zellkulturüberständen (je 25µl) wurden für die Analyse 1:1 mit 25µl sterilem PBS verdünnt. Die Serum-Proben (je 12,5µl) wurden entsprechend 1:4 mit 37,5µl sterilem PBS verdünnt. Zunächst wurden je 50µl des Top-Standards, der Standard-Verdünnungsreihe, sowie 50µl der Negativkontrolle auf die Platte vorgegeben. Anschließend wurden je 50µl der verdünnten Proben auf die Platten pipettiert. Nach erneutem gründlichen Mischen des *Capture Bead*-Gemisches für 15-30 Sekunden, wurden 50µl auf jedes Well gegeben. Die Platten wurden manuell leicht geschüttelt, bevor sie für 60 Minuten, lichtgeschützt, bei Raumtemperatur inkubiert wurden. In der Zwischenzeit wurde das Detektions-Antikörper Gemisch vorbereitet. Das Antikörper-Gemisch sollte für jedes Well 1µl des zytokin-spezifischen Detektions-Antikörpers pro zu testenden Zytokin bei einem Gesamtvolumen von 50µl pro Well enthalten. Um die Verdünnung für das nötige Gesamtvolumen zu erreichen, wurde steriles PBS verwendet. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden 50µl des Antikörper-Gemisches auf jedes Well gegeben und die Platten manuell leicht geschüttelt. Die Platten wurden dann für weitere 120 Minuten, lichtgeschützt, bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte die Zentrifugation der Platten bei 200 G (1075 rpm) für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen und die Wells in 150µl sterilem PBS resuspendiert. Die Messung erfolgte an einem BD™FACS Canto II und der BD™FACS Diva-Software v6.0. Die Auswertung der Messung erfolgte mit der FCAP Array Analysis Software v3.0 (SoftFlow Inc.).

#### **2.2.2.12.2 Messung mit Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)**

Beim ELISA handelt es sich um ein klassisches Immun-Assay, mit dem qualitative und semi-quantitative Analysen von löslichen Proteinen und zahlreichen weiteren Biomolekülen möglich ist. Es existieren verschiedene Variationen dieser Methode, wobei stets die Interaktion zwischen einem spezifischen Antikörper, seinem Antigen und einem Detektionsantikörper eine Rolle spielen. In der sogenannten *Sandwich*-ELISA Technik (siehe Abbildung 2.3) werden im ersten Schritt die Böden einer 96-Well Flachboden-Platte mit den spezifischen Antikörpern (sog. *Capture*-Antikörper) beschichtet. Nachdem unspezifische Bindungen mit speziellen Pufferlösungen blockiert worden sind, werden die zu testenden Proben, in denen das passende Antigen vermutet wird, in die Wells gegeben und für eine bestimmte Zeit inkubiert. Im Detektionsschritt wird ein weiterer Antikörper hinzugefügt, welcher ein anderes Epitop auf demselben Antigen spezifisch bindet. Meist ist dieser Antikörper mit einem Biotin-Molekül konjugiert, an welches in einem weiteren Schritt ein enzym-konjugiertes Streptavidin bindet. Durch Zugabe eines

Indikator-Substrats, welcher unter der Katalyse des gekoppelten Enzyms von farblos in farbig umschlägt, kann dann indirekt auf die Konzentration des Antigens in der Probe geschlossen werden. Gründliche Waschschrte sorgen dafür, dass nur hoch-affine Bindungen zwischen Antikörper und seinem Antigen bestehen bleiben. Die optischen Extinktion der einzelnen Wells werden in einem Photometer gemessen und ist proportional zur Konzentration des Substrats in der Probe. Um letztlich von Extinktion auf Konzentrationen schließen zu können, werden Standardkurven von Verdünnungsreihen mit bekannten Konzentrationen heran gezogen.



**Abb. 2.3) – Schematische Darstellung zum Prinzip einer Sandwich-ELISA**

a) zeigt das Innere eines, bereits mit *Capture*-Antikörpern vorbeschichteten Wells, in der das Ziel-Protein aus der Probe spezifisch an Antikörper bindet. b) zeigt das Well nach dem ersten Waschschrte und während der Inkubation mit dem biotinylierten Detektions-Antikörper, welcher ebenfalls spezifisch an das Ziel-Protein bindet. c) zeigt das Well nach dem zweiten Waschschrte und während der Inkubation mit Avidin-Meerrettichperoxidase (HRP), welches hochaffin an Biotin bindet. d) zeigt das Well nach dem finalen Waschen und während der Inkubation mit dem Indikator-Substrat, welches durch das Enzym HRP in aktives, farbiges Substrat katalysiert wird, dessen optische Dichte als Extinktion im Photometer quantifiziert werden kann.

Insgesamt wurde die Analyse für die Zytokine IFN- $\gamma$ , IP-10, MIP-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  durchgeführt. Für die Messung der Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  wurden ELISA *Ready-SET-Go!*®-Kits (eBioscience) verwendet und für die Zytokine IP-10 und MIP-1 $\alpha$  *Instant ELISA*®-Kits (eBioscience) eingesetzt. Bei den Proben handelte es sich um Seren aus Vollblutproben und Zellkulturüberstände aus den Stimulationsversuchen, die in 2.2.2.6-7

beschrieben wurden. Für jeden Standard und jede Probe wurden Duplikate gemessen. Alle Versuche wurden streng nach den mitgelieferten Protokollen durchgeführt und ausgewertet. Zunächst wurden die mitgelieferten Puffer und Verdünnungslösungen, sowie die Antikörper auf ihre Einsatzkonzentrationen verdünnt. Für den Einsatz der *Ready-SET-Go!*®-Kits mussten die Platten zu Beginn mit dem *Capture*-Antikörper beschichtet werden. Dafür wurden 100µl der *Capture* Antikörper-Lösung in jedes Well gegeben, die Platten versiegelt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach 5 gründlichen Waschschritten mit dem mitgelieferten Waschpuffer, wurden die Wells mit je 200µl der Verdünnungslösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. In der Zwischenzeit wurden die Standard-Verdünnungsreihe, sowie die zu testenden Proben entsprechend Tabelle 2.6 und 2.7 verdünnt und vorbereitet. Die Verdünnungen für die Proben, sowie die Auswahl der Probenart für die einzelnen Zytokine, wurden in arbeitsgruppen-internen Vorversuchen ermittelt.

**Tabelle 2.6 – Standard-Verdünnungsreihe für die ELISA *Ready-SET-Go!*®-Kits mit entsprechenden Proteinkonzentrationen**

	<b>Verdünnung</b>							
	Top Standard	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
<b>Protein (pg/ml)</b>	500	250	125	61,5	30,25	15	7,5	3,75

Die Standard-Verdünnungsreihe wurde in 100µl/Well-Einheiten auf ihre entsprechenden Wells verteilt. Die Einsatzmengen und Verdünnungsfaktoren der Proben pro Well für die verschiedenen Zytokine sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

**Tabelle 2.7 – Verdünnungsfaktoren der Proben für die zu testenden Zytokine im ELISA**

	<b>Verdünnung</b>		
<b>Zytokin</b>	<b>Vollblutprobe</b>	<b>PBMC-Überstand</b>	<b>Einsatzmenge/Well</b>
IFN-γ	1 : 10 (Positivkontrolle 1 : 50)	1 : 10 (Positivkontrolle 1 : 50)	100 µl
IP-10	1 : 1	Nicht durchgeführt	10 µl
MIP-1α	1 : 5	1 : 10	50 µl
TNF-α	Nicht durchgeführt	1 : 20 (Positiv- und Negativkontrolle 1 : 10)	100 µl

Die Platten wurden versiegelt und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Nach einem gründlichen Waschvorgang wurden 100µl der Detektions-Antikörper-Lösung auf die Wells gegeben und die Platte wurde nochmals versiegelt für 1 Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert. Es folgten ein weiterer Waschvorgang und die Zugabe von je 100µl Avidin-HRP pro Well mit anschließenden, weiteren 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Dem letzten Waschschrift folgte die Zugabe von je 100µl Indikator-Substratlösung in jedes Well und eine Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur, bevor die Reaktion mit je 50 µl pro Well 1-molarer Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) als „Stopp“-Lösung unterbrochen wurde. Bei den *Instant ELISA®*-Kits handelt es sich um sofort einsetz-fähige, mit *Capture*-Antikörper vorbeschichtete Platten, welche bereits die vortitrierte Standard-Verdünnungsreihe, sowie den biotinylierten Detektions-Antikörper und Streptavidin-HRP in lyophilisierter Form in den entsprechenden Wells vorliegen haben. Die Zugabe von destilliertem Wasser in die Wells der Standardreihe startet die Reaktion. In die Wells für die Messung von MIP-1 wurden 100µl destilliertes Wasser vorgelegt, bevor die Einsatzmengen der Proben, gemäß Tabelle 2.7 in die Wells hinzugegeben wurden. Für die Messung von IP-10 wurden entsprechend der abweichenden Einsatzmenge der Probe zuvor 140µl destilliertes Wasser vorgelegt. Die unterschiedlichen Einsatzmengen ergaben sich aus den Protokollen der Kits. Nach Zugabe der Proben wurden die Platten abgedeckt für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein gründlicher Waschschrift, bevor je 100µl der Indikator-Substratlösung in jeden Well gegeben wurde. Nach einer Inkubationsdauer von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Farbumschlags-Reaktion mit je 100µl 1-molarer Schwefelsäure (1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pro Well gestoppt. Alle Platten wurden bei einer Wellenlänge von 450 nm im Multimode Reader Infinite® M 200 (TecanGroup Ltd.) ausgelesen und mit der Magellan™ *Data Analysis Software* (TecanGroup Ltd.) ausgewertet.

### 2.2.3 Statistische Analyse

Für den statistischen Vergleich von nicht-parametrischen, unabhängigen Stichproben wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet. Für den Vergleich von nicht-parametrischen, abhängigen Stichproben wurde der Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon verwendet. Für die Korrelations-Analysen von nicht-parametrischen Daten wurde auf den Spearman-Rho Test zurückgegriffen. Des Weiteren wurde zum Vergleich von Datenzusammenhängen in 2 x 2 Kontingenztafeln der Exakte Test nach Fisher verwendet. Auf einen Test auf Normalverteilung wurde bei der kleinen Fallzahl von n=25 bewusst verzichtet.

Signifikanzen wurden mit den folgenden p-Werten beschrieben:

p > 0,1	nicht signifikant	p < 0,01	**
p < 0,1	Tendenz	p < 0,001	***
p < 0,05	*		

### 3 ERGEBNISSE

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer sensitiven und spezifischen Methode für den immunologischen Nachweis von NTM als Ursache einer LAP unklarer Ätiologie im Kindesalter. Darüber hinaus sollten weitere Zytokine identifiziert werden, welche für einen solchen Immun-Assay geeignet sein könnten. Es wurde ein Studienkollektiv von 25 Patienten rekrutiert und entsprechend der Ursache ihrer LAP in 3 Gruppen unterteilt. Patienten mit nachgewiesener mycobakterieller Ursache ihrer LAP wurden in die Gruppe „NTM-LAP“ (n=4) eingeordnet. Patienten mit nachgewiesener, nicht-mycobakterieller Ursache ihrer LAP wurden in die Gruppe „Non-NTM-LAP“ (n=8) und Patienten mit LAP unklarer Ätiologie wurden der Gruppe der „Verdachtsfälle“ (n=13) zugeordnet. Den Studienpatienten wurden heparinisierte Vollblutproben entnommen, aus denen PBMCs isoliert wurden. Diese PBMCs wurden sowohl in Kurzzeit-Stimulationsansätzen, als auch in Langzeit-Restimulationsansätzen mit mycobakteriellen Proteinextrakten (PPD) *in vitro* inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer nach intrazellulärer Zytokinfärbung (ICS) auf spezifische Zytokinantworten untersucht. Des Weiteren wurden PBMC-Kulturen und Vollblut-Proben ebenfalls mit mycobacteriellen PPD *in vitro* inkubiert. Die gewonnenen Überstände wurden mittels CBA und ELISA auf spezifische Zytokinprofile untersucht. Eine Infektion mit *M. tuberculosis* wurde im Vorfeld durch einen *IFN- $\gamma$  Release Assay* (IGRA) ausgeschlossen. Aufgrund der stark limitierten Mengen an Probenmaterial unserer Studienpatienten bzw. unvermeidbaren Verlusten während der Aufbereitung der Proben, konnten nicht alle Analysen für jeden einzelnen Patienten durchgeführt werden. So fanden von den 25 Patienten, die initial in die Studie aufgenommen wurden, nur 23 Patienten ihren Weg in die Auswertungen und Analysen. Tabelle 3.1 zeigt eine Übersicht über die vorhandenen Datenpunkte jedes Studienpatienten, die in die Analysen den Ergebnisteil dieser Arbeit eingeflossen sind.

**Tabelle 3.1 – Übersicht über die durchgeführten Analysen und vorhandenen Datenpunkte**

	Patient	FACS D1	FACS D7	CBA (VB)	CBA (PBMC)	ELISA (VB)	ELISA (PBMC)	Kommentar
NTM-LAP	A	✓	✓	✗	✗	✗	✗	zu wenig Material
	B	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
	C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
	D	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
Non-NTM-LAP	E	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
	F	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
	G	✓	✓	✓	✗	✓	✗	Probe nicht vorhanden
	H	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
	I	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
	J	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
	K	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
	L	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
Verdachtsfälle	M	✓	✓	✗	✓	✗	✓	zu wenig Material
	N	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
	O	✗	✗	✓	✓	✓	✓	zu geringe Zellzahlen im FACS
	P	✗	✗	✓	✓	✓	✓	zu geringe Zellzahlen im FACS
	Q	✓	✗	✓	✓	✓	✓	zu geringe Zellzahlen im FACS
	R	✗	✓	✓	✓	✓	✓	Probe nicht vorhanden
	S	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
	T	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
	U	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
	V	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-
	W	✗	✗	✓	✗	✓	✗	zu wenig Material
	X	✗	✗	✗	✗	✗	✗	zu wenig Material
Y	✓	✗	✓	✓	✓	✓	zu wenig Material	

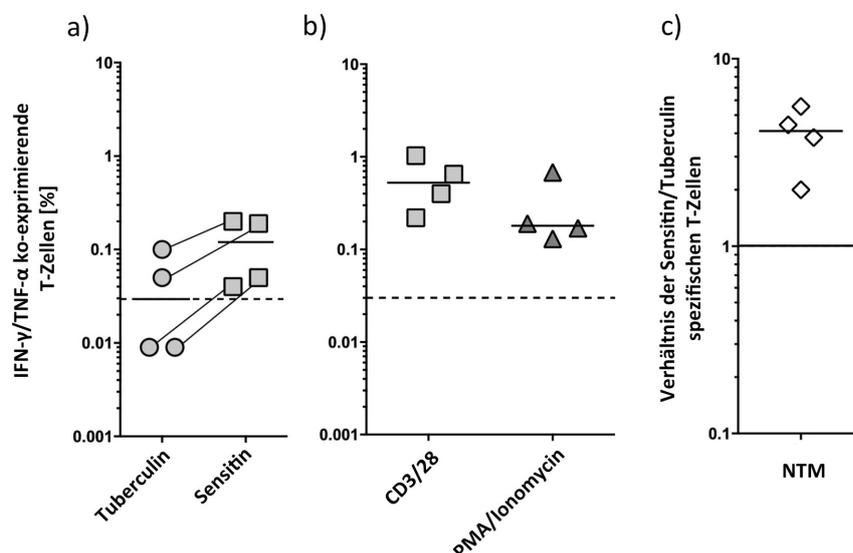
<b>NTM-LAP:</b>	Lymphadenopathie durch nachweislich Nicht-Tuberkulöse Mykobakterien
<b>Non-NTM-LAP:</b>	Lymphadenopathie durch nachweislich nicht-mycobakterielle Ursache
<b>Verdachtsfälle:</b>	Lymphadenopathien unklarer Ursache
<b>FACS D1:</b>	Durchflusszytometrische Daten nach Kurzzeit-Stimulation
<b>FACS D7:</b>	Durchflusszytometrische Daten nach 2-Hit Langzeit-Stimulation
<b>CBA:</b>	Daten aus dem <i>Cytometric Bead Array</i> <sup>®</sup>
<b>ELISA:</b>	Daten aus dem <i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
<b>VB:</b>	Vollblutproben
<b>PBMC:</b>	Zellkulturüberstände von isolierten peripheren mononukleäre Zellen

### 3.1 Analysen zur Identifizierung von mycobakteriellen Infektionen

#### 3.1.1 Durchflusszytometrische Messung von intrazellulären Zytokinen (ICS) in T-Zellen nach Kurzzeit-Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen

Wie bereits in Kapitel 1.4.2 beschrieben, gelang es Magdorf *et al.* nach einer Kurzzeit-Stimulation von T-Zellen mit mycobakteriellen Proteinen, anhand von spezifischen Zytokinantworten, mycobakterielle Infektionen durchfluss-zytometrisch zu verifizieren<sup>158</sup>. Unsere Versuche sollten prüfen, ob durch Zytokinantworten stimulierter T-Zellen, NTM von anderen Ursachen einer LAP abgegrenzt werden können und ob durch den differentiellen Einsatz von zwei verschiedenen mycobakteriellen Proteinextrakten (PPD Tuberculin & PPD Sensitin) diese Zytokinantworten auch spezifisch auf NTM zurückgeführt werden können. In den Auswertungen dieses Experiments demonstrierten alle Patienten aus der „NTM-LAP“-Gruppe (n=4) nach der Kurzzeitstimulation mit PPD Sensitin, durchfluss-zytometrisch eine Zytokinantwort, in Form von IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ko-

exprimierenden T-Zellen, oberhalb des assay-bedingten Detektionslimits von 0,03%, wohin gegen die Zytokinantworten der Gruppe auf die Stimulation mit PPD Tuberculin mit 2 Patienten oberhalb des Detektionslimits, weniger eindeutig ausfielen (Abb. 3.1a). Der Vergleich der individuellen Zytokinantworten der „NTM-LAP“-Gruppe auf die Stimulation mit PPD Tuberculin und PPD Sensitin zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied. Die Bildung des Verhältnisses aus den Zytokinantworten auf PPD Sensitin und PPD Tuberculin (Sensitin/Tuberculin-Verhältnis) für jeden Patienten zeigte jedoch, dass die Reaktion auf PPD Sensitin in jedem Patienten stärker (Verhältnis > 1) ausfiel, als die Reaktion auf PPD Tuberculin (Abb. 3.1c).

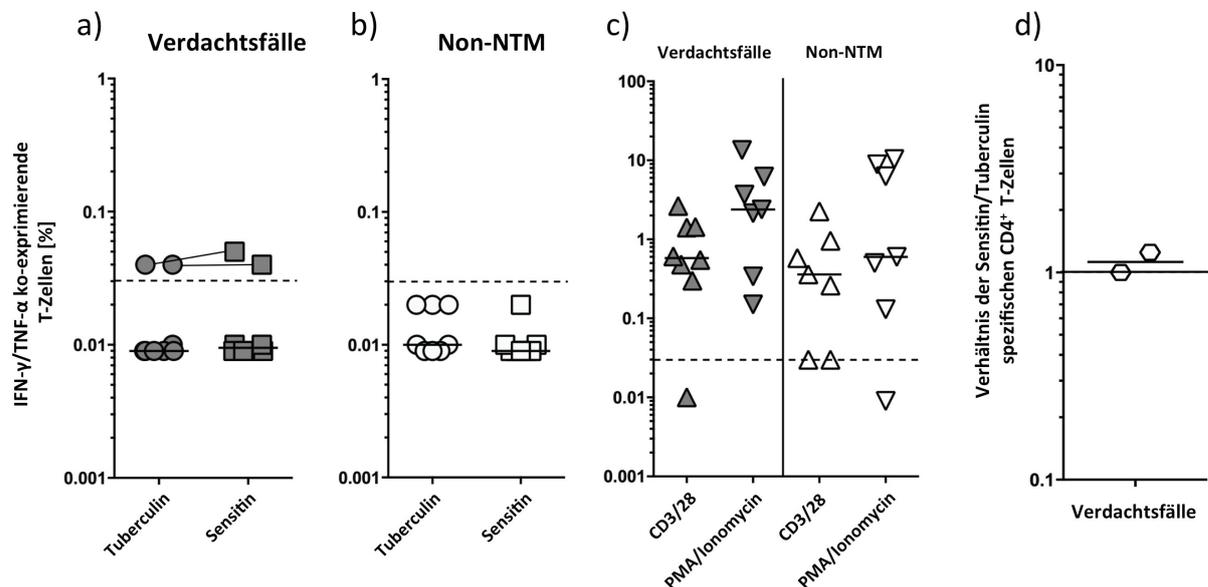


**Abb. 3.1) - IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ko-exprimierende T-Zellen aus isolierten PBMCs [%] im Durchflusszytometer nach *in vitro* Kurzzeit-Stimulation I**

a) zeigt die Zytokinantworten auf PPD Tuberculin bzw. PPD Sensitin von Patienten mit einer nachgewiesenen NTM-Infektion als Ursache der LAP (NTM-LAP; n=4; hellgraue Symbole). Symbole desselben Patienten sind mit geraden Linien verbunden. b) zeigt die Zytokinantworten derselben Patienten auf CD3/28 Dynabeads® (hellgraue Quadrate) bzw. PMA/Ionomycin (dunkelgraue Dreiecke) als Positivkontrolle. Die gestrichelten, waagerechten Linien zeigen das Detektionslimit für die durchfluss-zytometrische Analysen (0,03 %). Die durchgezogenen, waagerechten Linien zeigen jeweils den Median. c) zeigt die Verhältnisse (*Ratios*) der einzelnen Zytokinantworten auf PPD Sensitin und PPD Tuberculin für die NTM-LAP Patienten. Jedes Symbol zeigt das *Ratio* für einen Patienten. Die durchgezogene waagerechte Linie markiert den Indifferenzpunkt 1.

Als zweites Ziel sollte untersucht werden, ob es durch die oben genannte Methode möglich ist in einer Kohorte von Patienten mit einer LAP unbekannter Ätiologie, NTM als mögliche Ursache zu identifizieren. In der Gruppe der „Verdachtsfälle“ (n=8) zeigten 2 Patienten (Patient U + Y) eine relevante Zytokinantwort nach Stimulation mit beiden mycobakteriellen Antigenen (Abb. 3.2a). Die Stärke der Zytokinantworten auf die beiden mycobakteriellen Antigene zeigte sich für Patient Y gleich. Patient U zeigte eine leicht stärkere Reaktion auf PPD Sensitin mit einem entsprechenden Sensitin-Tuberculin-

Verhältnis  $> 1$  (Abb. 3.2d). Die restlichen Patienten demonstrierten keine detektierbaren Zytokinreaktionen. Keiner der Patienten aus der „Non-NTM-LAP“-Gruppe (n=8) zeigte relevante Zytokinantworten auf PPD Tuberculin oder PPD Sensitin (Abb. 3.2b).

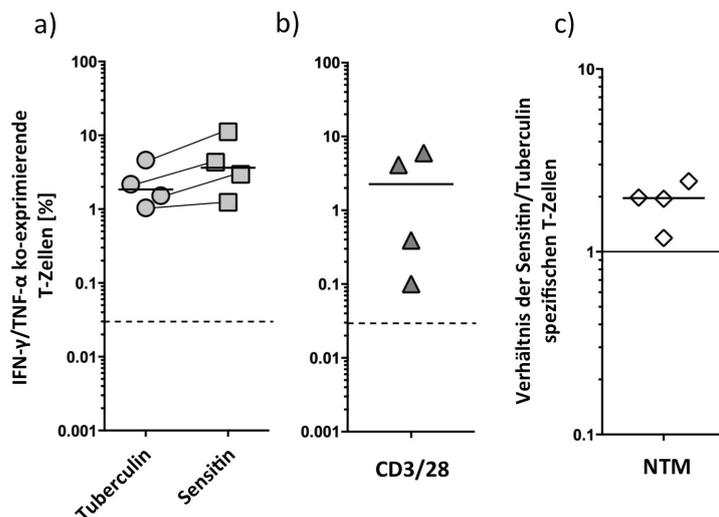


**Abb. 3.2) - IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ko-exprimierende T-Zellen aus isolierten PBMCs [%] im Durchflusszytometer nach *in vitro* Kurzzeit-Stimulation II.** a) zeigt die Zytokinantworten auf PPD Tuberculin bzw. PPD Sensitin von Patienten mit einer LAP unklarer Ätiologie (Verdachtsfälle; n=8; dunkelgraue Symbole). b) zeigt die entsprechenden Zytokinantworten von Patienten mit einer nachgewiesenen, nicht-mycobakteriellen Ursache ihrer LAP (Non-NTM-LAP; n=8; weiße Symbole). c) zeigt die Zytokinantworten nach Stimulation mit CD3/28-Dynabeads® (Dreieck Spitze oben) und PMA/Ionomycin (Dreieck Spitze unten) als Positivkontrollen. Die gestrichelten, waagerechten Linien zeigen das Detektionslimit für die durchfluss-zytometrische Analysen (0,03 %). Die durchgezogenen, waagerechten Linien zeigen jeweils den Median. Jedes Symbol repräsentiert einen Patienten. Symbole desselben Patienten sind mit geraden Linien verbunden. d) zeigt die Verhältnisse (*Ratios*) der einzelnen Zytokinantworten auf PPD Sensitin und PPD Tuberculin (Sensitin/Tuberculin) der reaktiven Patienten. Jedes Symbol zeigt das *Ratio* für einen Patienten. Die durchgezogene waagerechte Linie markiert den Indifferenzpunkt 1.

### 3.1.2 Langzeit-Restimulation & durchflusszytometrische Messung von T-Zellen mit mycobakteriellen Antigenen

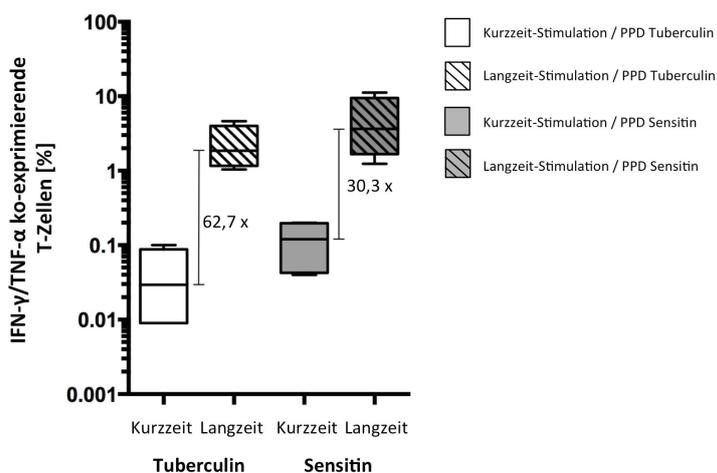
Schuck *et al.* konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass eine Langzeit-Restimulation zu einer signifikanten Verstärkung von antigen-spezifischen T-Zellreaktionen führt<sup>184</sup>. Um eventuelle indifferente Zytokinantworten auf PPD Tuberculin oder PPD Sensitin aus der Kurzzeitstimulation im Sinne einer Sensitivitätssteigerung aufzudecken wurden isolierte PBMCs in einem solchen Restimulationsversuch durchfluss-zytometrisch untersucht (s. Kapitel 2.2.2.7-11). Zunächst konnte gezeigt werden, dass die sensitin-spezifischen Zytokinantworten der 4 gesicherten NTM-Fälle aus der „NTM-LAP“-Gruppe (n=4) ca. 20 bis 75-fach stärker (Median: 30,3-fach) ausfielen, als in der Kurzzeit-Stimulation (Abb. 3.3a + 3.4). Die Zytokinantworten auf PPD Tuberculin zeigten ebenfalls eine deutliche Zunahme (Median: 62,7-fach). Es zeigte sich erneut kein statistischer Unterschied

zwischen den Zytokinantworten auf PPD Tuberculin und PPD Sensitin. Bei der Bildung des Sensitin/Tuberculin-Verhältnisses zeigte sich, dass die individuellen Zytokinantworten auf PPD Sensitin für jeden Patienten stärker ausfielen, als auf PPD Tuberculin (Abb. 3.3c).



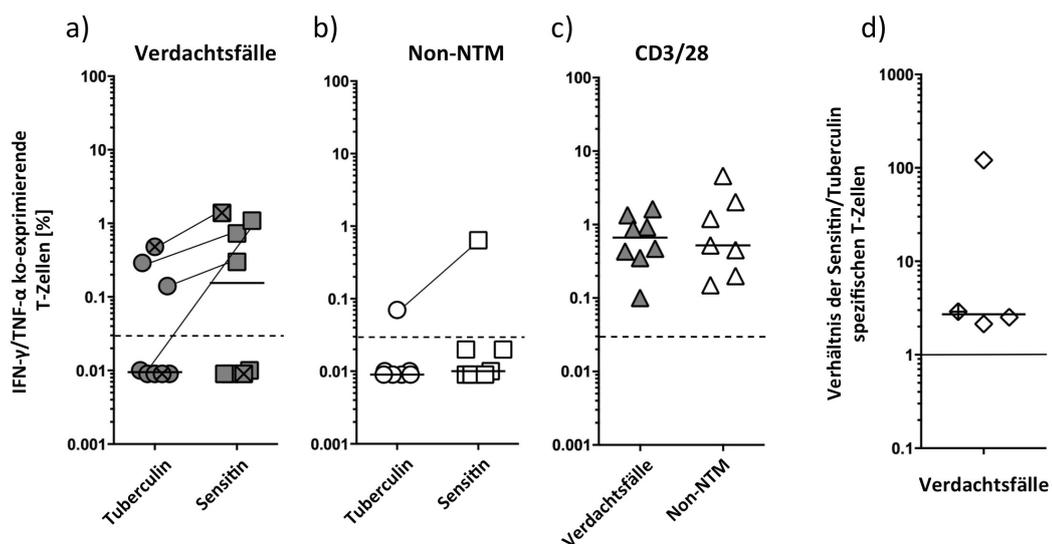
**Abb. 3.3) - IFN-γ/TNF-α ko-exprimierende T-Zellen aus isolierten PBMCs [%] im Durchflusszytometer nach in vitro Langzeit-Restimulation I**

a) zeigt die Zytokinantworten nach Stimulation mit PPD Tuberculin bzw. PPD Sensitin von Patienten mit einer nachgewiesenen NTM-Infektion als Ursache der LAP (NTM-LAP; n=4; graue Symbole). Symbole desselben Patienten sind mit geraden Linien verbunden. b) zeigt die Zytokinantworten derselben Patienten auf CD3/28 Dynabeads® (dunkelgraue Dreiecke) als Positivkontrolle. Die gestrichelten, waagerechten Linien zeigen das Detektionslimit für die durchfluss-zytometrische Analysen (0,03 %). Die durchgezogenen, waagerechten Linien zeigen jeweils den Median. c) zeigt die Verhältnisse (Ratios) der einzelnen Zytokinantworten auf PPD Sensitin und PPD Tuberculin für die NTM-LAP Patienten. Jedes Symbol zeigt das Ratio für einen Patienten. Die durchgezogene waagerechte Linie markiert den Indifferenzpunkt 1.



**Abb. 3.4) – Gegenüberstellung der Anteile IFN-γ/TNF-α ko-exprimierender T-Zellen aus isolierten PBMCs [%] nach in vitro Kurzzeit-Stimulation und in vitro Langzeit-Restimulation für die NTM-LAP-Gruppe.** Dargestellt ist die Verstärkung der Zytokinantworten der T-Zellen im Langzeit-Restimations-Assay (schraffierte Boxen) im Vergleich zur Kurzzeit-Stimulation (leere Boxen) nach *in vitro* Stimulation mit PPD Tuberculin (weiß) und PPD Sensitin (grau). Die Höhe der Blox-Plots markiert das Maximum und Minimum der jeweils gemessenen Werte. Die waagerechte Linie markiert den Median. Die Klammern repräsentieren die Standardabweichung.

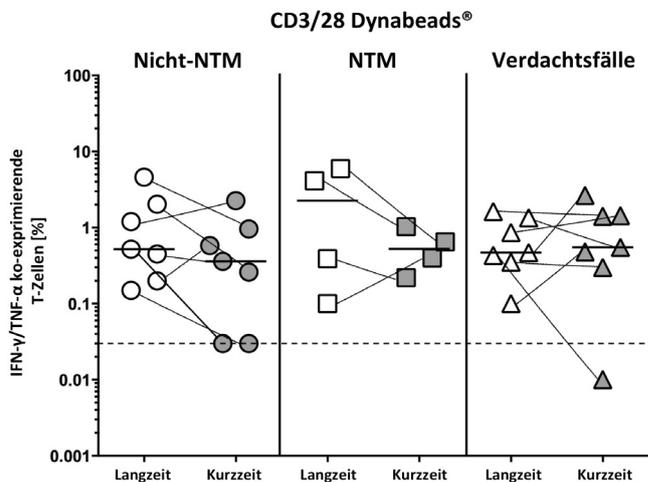
In der Gruppe der Verdachtsfälle (n=7) zeigten sich 4 Patienten (Patienten N, R, T, U) auf die Stimulation mit PPD Sensitin hin mit einer deutlichen Zytokinantwort oberhalb des Detektionslimits, wobei nur Patient U bereits in der Kurzzeit-Stimulation eine relevante T-Zellreaktion gezeigt hatte (Abb. 3.5a; mit Kreuz markiert). Diese Reaktion fiel analog zu den Ergebnissen in der „NTM-LAP“-Gruppe, um ein vielfaches (ca. 10-30x) verstärkt aus. Patient Y hingegen zeigte im Restimulations-Versuch keine nennenswerte Zytokinantwort (ebenfalls mit Kreuz markiert). Auf PPD Tuberculin zeigten 3 der 4 genannten Patienten eine messbare Zytokinantwort, wobei diese alle schwächer ausfielen, als die Reaktion auf das PPD Sensitin, was sich in den Sensitin/Tuberculin-Verhältnissen (Abb. 3.5d) zeigt. Für Patient R lagen keine Daten zur Kurzzeit-Stimulation vor. In der „Nicht-NTM-LAP“-Gruppe (n=8) zeigte sich bei Patient K eine deutliche Zytokinantwort auf beide mycobakteriellen Antigene, wohin gegen die restliche Patienten keinerlei Reaktion zeigten (Abb. 3.5b).



**Abb. 3.5) - IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ko-exprimierende T-Zellen aus isolierten PBMCs [%] im Durchflusszytometer nach *in vitro* Langzeit-Restimulation II.** a) zeigt die Zytokinantworten von Patienten mit einer LAP unklarer Ätiologie (Verdachtsfälle; n=7; dunkelgraue Symbole). b) zeigt die entsprechenden Zytokinantworten von Patienten mit einer nachgewiesenen, nicht-mycobakteriellen Ursache ihrer LAP (Non-NTM-LAP; n=8; weiße Symbole). c) zeigt die Zytokinantworten nach Stimulation mit CD3/28-Dynabeads® (Dreieck) als Positivkontrolle. Die gestrichelten, waagerechten Linien zeigen das Detektionslimit für die durchfluss-zytometrischen Analysen (0,03 %). Die durchgezogenen, waagerechten Linien zeigen jeweils den Median. Jedes Symbol repräsentiert einen Patienten. Patienten, die bereits in der Kurzzeit-Stimulation reagiert haben, sind mit einem Kreuz markiert. Symbole desselben Patienten sind mit geraden Linien verbunden. d) zeigt die Verhältnisse (*Ratios*) der einzelnen Zytokinantworten auf PPD Sensitin und PPD Tuberculin (Sensitin/Tuberculin) der reaktiven Patienten. Jedes Symbol zeigt das *Ratio* für einen Patienten. Die durchgezogene waagerechte Linie markiert den Indifferenzpunkt 1.

Um der Frage nach einer zuverlässigen Verstärkung der Zytokinantworten und damit einer potentiellen Sensitivitätssteigerung durch die Langzeit-Restimulation weiter nachzugehen, wurden die Positivkontrollen beider Stimulationsversuche nochmals

vergleichend herangezogen. In der direkten Gegenüberstellung zeigt sich, dass die Verstärkung der Zytokinantworten nicht bei allen Patienten zuverlässig zu sehen war und bei einzelnen Patienten die Reaktionen nach Langzeitstimulation sogar schwächer ausfielen, als zuvor nach Kurzzeit-Stimulation beobachtet (Abb. 3.6).

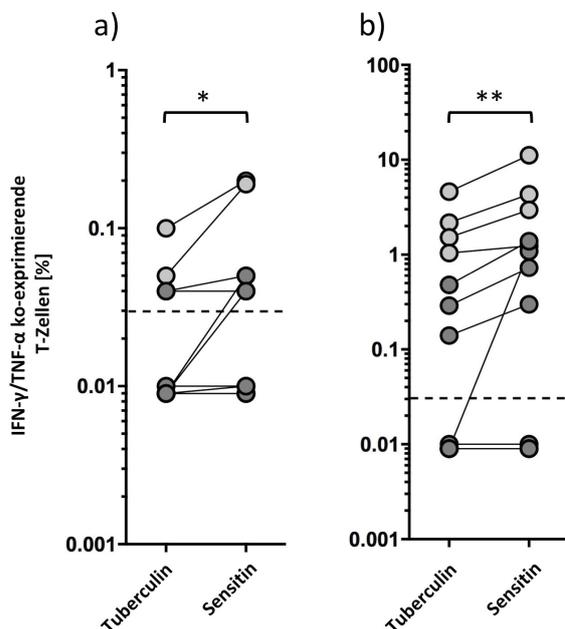


**Abb. 3.6) - Gegenüberstellung der Zytokinantworten aus der Kurzzeit-Stimulation (weiße Symbole) und der Langzeit-Restimulation (graue Symbole) auf CD3/28 Dynabeads® als unspezifischen Stimulus.**

Gezeigt werden die Anteile an IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ko-exprimierende T-Zellen aus isolierten PBMCs [%] nach CD3/28-Dynabead®-Stimulation für die „Non-NTM LAP“-Gruppe (Kreise), die „NTM-LAP“ Gruppe (Quadrate) und die Gruppe der Verdachtsfälle (Dreiecke). Die gestrichelten, waagerechten Linien zeigen das Detektionslimit für die durchflusszytometrische Analysen (0,03 %). Die durchgezogenen, waagerechten Linien zeigen jeweils den Median. Jedes Symbol repräsentiert einen Patienten. Symbole desselben Patienten sind mit geraden Linien verbunden.

### 3.1.3 Komparative Analyse & Korrelation der Daten aus der Durchflusszytometrie

Fasst man die „NTM-LAP“-Gruppe und der Gruppe der Verdachtsfälle zusammen und vergleicht die jeweiligen Zytokinantworten auf PPD Tuberculin und PPD Sensitin, zeigen sich, sowohl für die Kurzzeit-Stimulation (\* $p=0.03$ ; zweiseitig getestet), als auch für die Langzeit-Restimulation (\*\* $p=0.008$ ; zweiseitig getestet) signifikant stärkere Zytokinantworten auf die Stimulation mit PPD Sensitin (s. Abb. 3.7).

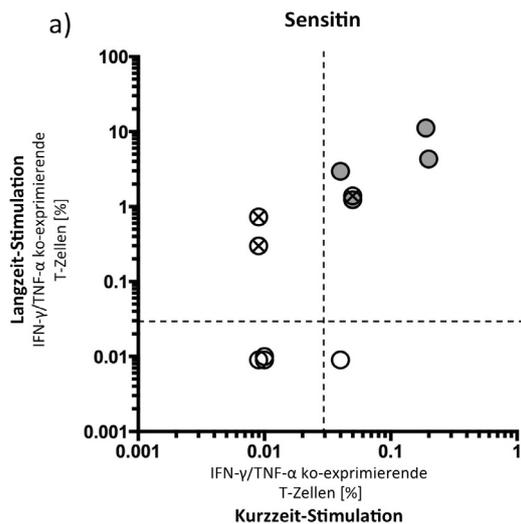


**Abb. 3.7) - Gegenüberstellung der Zytokinreaktion auf PPD Tuberculin und PPD Sensitin.**

a) zeigt die Anteile an IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ko-exprimierende T-Zellen aus isolierten PBMCs [%] der „NTM-LAP“-Gruppe (hellgrau;  $n=4$ ) und der Gruppe der Verdachtsfälle (dunkelgrau;  $n=8$ ) nach Kurzzeit-Stimulation mit PPD Tuberculin und PPD Sensitin im Vergleich. b) zeigt die entsprechenden Anteile an IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ko-exprimierenden T-Zellen aus isolierten PBMCs [%] nach Langzeit-Restimulation mit PPD Tuberculin und PPD Sensitin im Vergleich. Die gestrichelten, waagerechten Linien zeigen das Detektionslimit für die durchflusszytometrische Analysen (0,03 %). Symbole desselben Patienten sind mit geraden Linien verbunden. Signifikante Unterschiede im Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon sind, wie folgt markiert: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (zweiseitig getestet).

In einer weiteren Analyse wurde die zusammengefassten Daten der „NTM-LAP“-Gruppe und der Gruppe der Verdachtsfälle, der „Non-NTM-LAP“-Gruppe gegenübergestellt und auf Zusammenhänge zwischen den Gruppen und einer signifikanten Zytokinantwort oberhalb des Detektionslimits auf die Stimulation mit PPD Sensitin untersucht. Es zeigte sich im Exakten Test nach Fisher für die Kurzzeit-Stimulation zunächst ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Zytokinreaktion unterhalb des Detektionslimits und der Zugehörigkeit zur „Non-NTM-LAP“-Gruppe ( $p=0.04$ ; zweiseitig getestet). Für die Langzeit-Restimulation zeigte sich dann schließlich auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Zytokinantwort oberhalb des Detektionslimits auf die Stimulation mit PPD Sensitin und der Zugehörigkeit zur zusammengefassten Gruppe „NTM-LAP & Verdachtsfälle“ ( $p=0.02$ ; zweiseitig getestet).

Um die Daten aus beiden ICS-Stimulationsversuchen auf weitere Korrelationen untersuchen zu können, wurden die Datenpunkte der Patienten aus der „NTM-LAP“-Gruppe ( $n=4$ ; grau markiert) und der Gruppe der Verdachtsfälle ( $n=7$ , weiß markiert) erneut zusammengefasst und in einem Streudiagramm dargestellt (Abb. 3.8). Patienten für die nur Datenpunkte für einen der beiden Stimulationsansätze zur Verfügung standen (s. Tab. 3.1), wurden bei der Darstellung nicht berücksichtigt. Das Streudiagramm für die Stimulation mit PPD Sensitin zeigt insgesamt einen positiven Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Kurzzeit- und Langzeit-Restimulation, welcher sich auch in einer signifikanten Korrelation ( $r = 0.71$ ,  $p = 0.019$ ; zweiseitig getestet) widerspiegelt. Patienten mit starker Zytokinreaktion auf PPD Sensitin in der Kurzzeit-Stimulation zeigen demnach ebenfalls eine starke Zytokinantwort auf PPD Sensitin in der Langzeit-Stimulation. Der starke positive Zusammenhang fällt v.a. für die Patienten aus der Gruppe der „NTM-LAP“-Gruppe, sowie Patient U aus der Gruppe der Verdachtsfälle (markiert mit Kreuz) auf, die für beide Versuche deutlich oberhalb des Detektionslimit liegen. Zwei weitere Patienten (N + T) zeigten nur in der Langzeit-Stimulation einer messbare Zytokinreaktion. Für Patient R lagen keine Daten aus der Kurzzeit-Stimulation vor.



**Abb. 3.8) – Korrelation der durchflusszytometrischen Daten aus den Kurzzeit- und den Langzeit-Restimulationsversuchen.** Gezeigt wird die Gegenüberstellung der Anteile der IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ko-exprimierenden T-Zellen [%] aus den ICS-Versuchen. Graue Symbole repräsentieren Patienten aus der „NTM-LAP“-Gruppe (n=4). Weiße Symbole repräsentieren die Patienten aus der Gruppe der „Verdachtsfälle“ (n=7). Kreuze markieren Patienten mit starker Reaktion im ICS-Langzeit-Versuch (n=3). Gestrichelte Linien repräsentieren die Detektionsgrenzen für die jeweiligen Assays (0,03%). Statistische Korrelationen wurde über den Spearmanrho Test ermittelt.

### 3.2 Identifizierung von weiteren Zytokinen für den Nachweis von mycobakteriellen Infektionen

#### 3.2.1 Zytokinauswahl für den Cytometric Bead Array® (CBA) und Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

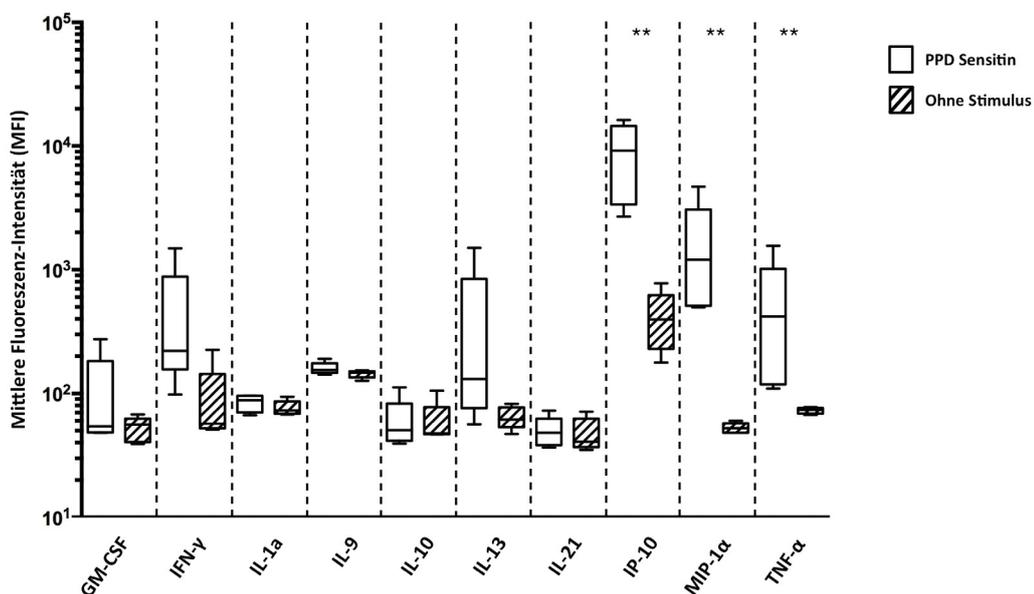
Die Eigenschaft des CBA multiple Biomarker simultan in einer einzelnen geringen Probenmenge zu untersuchen und semi-quantitativ zu bestimmen, machte es zu einer idealen Methode um Zytokinen zu identifizieren, welche bisher nicht zur Charakterisierung von Immunantworten auf mycobakterielle PPD bzw. Antigene eingesetzt werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich weitere, bisher unerkannte NTM-Patienten durch diese Methode identifizieren lassen. Wie bereits in Kapitel 2.2.2.12 beschrieben wurden neben IFN- $\gamma$  als Goldstandard und TNF- $\alpha$ , 8 weitere Zytokinkandidaten (s. Tabelle 3.2) ausgewählt.

**Tabelle 3.2 – Liste der untersuchten Zytokine mit den BD™CBA Flex Sets**

GM-CSF	IL-13
IFN- $\gamma$	IL-21
IL-1 $\alpha$	IP-10
IL-9	MIP-1 $\alpha$
IL-10	TNF $\alpha$

In einem Vorversuch wurden die Vollblutproben von 5 Patienten nach dem Kurzzeit-Stimulationsprotokoll mit mycobakteriellen PPD versetzt und wie in Kapitel 2.2.2.12 beschrieben im CBA untersucht. Bei den ausgewählten Patienten handelte es sich um Patient B aus der „NTM-LAP“-Gruppe, sowie den Patienten N, R, T und U aus der Gruppe

der Verdachtsfälle, die in den ICS-Versuchen durchfluss-zytometrisch bereits starke Zytokinantworten auf die Stimulation mit PPD Sensitin gezeigt hatten (n=5). Ziel war es neben IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , weitere Zytokine zu identifizieren, die bei mycobakteriellen Infektionen exprimiert werden. In den mit PPD Sensitin stimulierten Proben ergaben sich signifikant höhere Zytokinantworten für IP-10, MIP-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$ , im Vergleich zu den Kontroll-Proben ohne Stimulus (Abb. 3.9). Diese 3 Zytokine, sowie IFN- $\gamma$  als Goldstandard wurden für die weiteren Untersuchungen ausgewählt und weiterführend für alle Patienten analysiert. Für die Darstellung der Zytokinantworten wurde bewusst die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) als Surrogatparameter gewählt, da aufgrund von z.T. fehlerhaften Standardkurven eine einheitliche Umrechnung in Konzentrationseinheiten nicht möglich war.



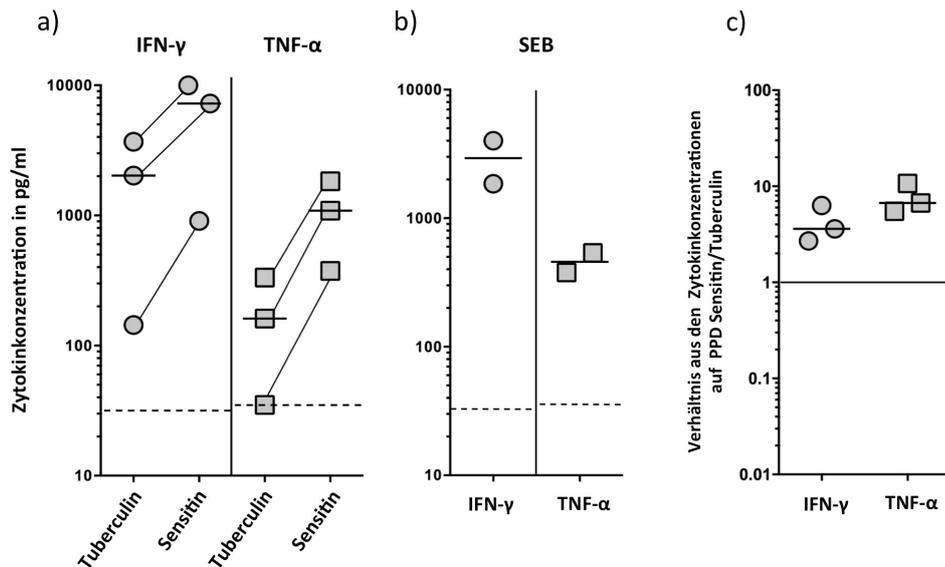
**Abb. 3.9) – Identifizierung von relevanten Zytokinkandidaten im Cytometric Bead Array® (CBA)** - Gezeigt werden die gemessenen Zytokinantworten aus Vollblut-Überständen nach 16-20 Std. *in vitro* Kurzzeit-Stimulation mit PPD Sensitin (weiß) und ohne Stimulus (schraffiert). Die Stärke der jeweilig gemessenen Zytokinantworten wird durch die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) ausgedrückt. Die Länge der Box repräsentiert die Spanne zwischen Maximal- und den Minimalwert. Die waagerechte Linie repräsentiert jeweils den Median. Die Klammern markieren die jeweiligen Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede im Mann-Whitney-U Test sind, wie folgt markiert: \*\*p < 0,01 (zweiseitig getestet).

Für die folgenden Versuche wurden, wie bereits in Kapitel 2.2.2.6-7 beschrieben Vollblutproben, sowie isolierte PBMCs mit mycobakteriellen PPD inkubiert. Nach 16-20 Stunden wurden die Überstände gerntet und zur Bestimmung der Zytokinantworten im CBA untersucht. Durch einen Lieferengpass der Firma BD™ waren das für die Vorversuche eingesetzten BD™ CBA Flex Kit für das Zytokin MIP-1 $\alpha$  auf unbestimmte Zeit nicht verfügbar. Aus Mangel an Alternativen wurden die Experimente

ohne dieses Flex Kit durchgeführt und die Untersuchung von MIP-1 $\alpha$  auf Versuche im ELISA verlagert. Wie aus Tabelle 3.1 zu entnehmen stand für einzelne Patienten nicht genug Probenmaterial zur Verfügung, um Überstände für diese Experimente zu generieren. Das ELISA wurde aufgrund seiner weit verbreiteten Anwendung, hohen Validität sowie der guten Handhabbarkeit als zusätzliche Untersuchungsmethode für diese Arbeit ausgewählt. Wie bereits in Kapitel 2.2.2.12.2 (Tabelle 2.7) beschrieben, wurden IFN- $\gamma$  sowie MIP-1 $\alpha$ , sowohl in Vollblut-Überständen, als auch in PBMC-Überständen untersucht. Die Untersuchungen für IP-10 fanden hingegen nur in Vollblut-Überständen; für TNF- $\alpha$  entsprechend nur in PBMC-Überständen statt.

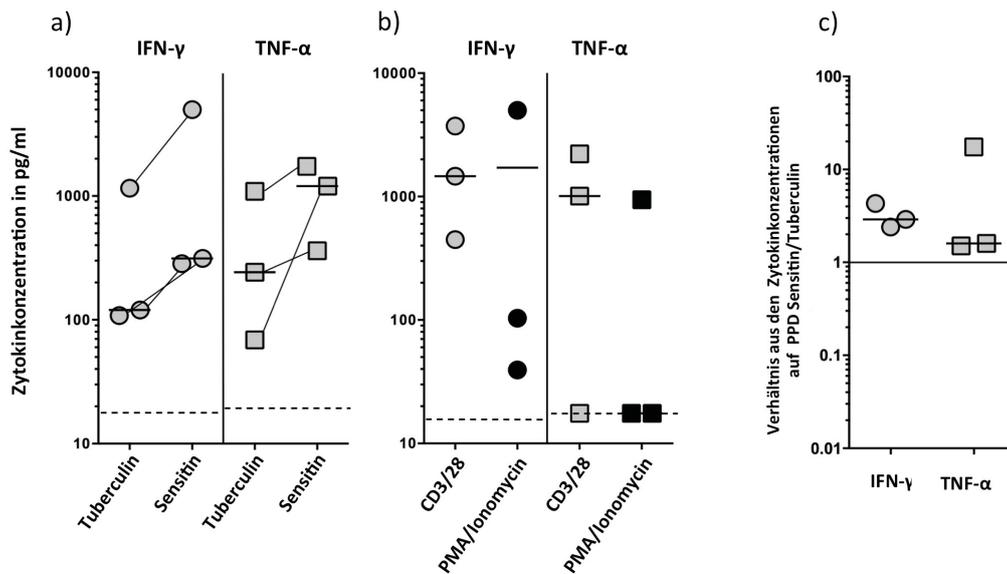
### **3.2.2 Zytokinanalysen in bestätigten NTM-Infektionen im CBA**

In den Vollblutproben der „NTM-LAP“-Gruppe (n=3) zeigten alle Patienten erhöhte Konzentrationen für IFN- $\gamma$ , wobei diese auf Stimulation mit PPD Sensitin hin für jeden Patienten deutlich stärker ausfielen, als auf Stimulation mit PPD Tuberculin (Abb. 3.10a). Die Bildung des Verhältnisses aus den gemessenen Zytokinkonzentrationen auf PPD Sensitin und PPD Tuberculin (Sensitin/Tuberculin-Verhältnis) spiegelte dies gut wider (Abb. 3.10c). Ein Vergleich im Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon reichte, aufgrund der geringen Patientenzahl, jedoch nicht für eine statistische Signifikanz. Ein sehr ähnliches Bild zeigte sich für die TNF- $\alpha$  Konzentrationen (Abb. 3.10a + c). Um falsch-negative Reaktionen auszuschließen wurden die Versuchsansätze mit den unspezifischen Stimulantien CD3/28-Dynabeads® und PMA/Ionomycin als Positivkontrollen versetzt und entsprechend im CBA gemessen. Es musste allerdings im Laufe der Experimente festgestellt werden, dass die Reaktionen durch die o.g. Stimulantien in Vollblut-Überständen zu keiner ausreichenden Induktion von unspezifischer Zytokinexpression führten (Daten nicht gezeigt). Daher wurde das Protokoll auf den unspezifischen Stimulus Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) umgestellt. Es ließen sich so nur noch für eine kleine Minderheit der Patienten Daten für die Positivkontrolle generieren (Abb. 3.10b).



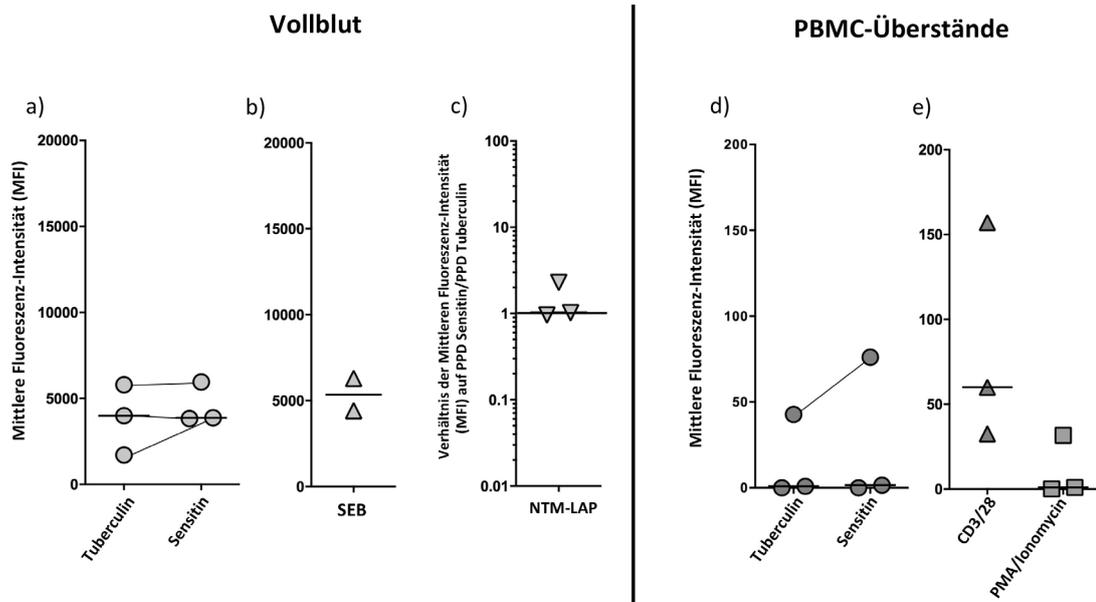
**Abb. 3.10) – IFN- $\gamma$  / TNF- $\alpha$  Expression im CBA aus Vollblutproben der „NTM-LAP“-Gruppe nach *in vitro* Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen** - a) zeigt die gemessenen Konzentrationen [pg/ml] von IFN- $\gamma$  (Kreise) und TNF- $\alpha$  (Quadrate) in Vollblutproben aus der „NTM-LAP“-Gruppe (hellgrau; n=3) Stimulation mit PPD Tuberculin bzw. PPD Sensitin. Symbole desselben Patienten sind mit geraden Linien verbunden. b) zeigt die jeweiligen Zytokinantworten auf Stimulation mit SEB als Positivkontrolle. Die waagerechten, gestrichelten Linien zeigen das untere Detektionslimit (IFN- $\gamma$ : 31,68 pg/ml / TNF- $\alpha$ : 35,04 pg/ml) des jeweiligen Assays. Die durchgezogenen, waagerechten Linien zeigen jeweils den Median. Jedes Symbol repräsentiert einen Patienten. c) zeigt die Verhältnisse (*Ratios*) der einzelnen Zytokinantworten auf PPD Sensitin und PPD Tuberculin (Sensitin/Tuberculin) der „NTM-LAP“-Gruppe. Jedes Symbol zeigt das *Ratio* für einen Patienten. Die durchgezogene waagerechte Linie markiert den Indifferenzpunkt 1.

In den PBMC-Überständen demonstrierten alle Patienten der „NTM-LAP“-Gruppe (n=3) ebenfalls deutlich messbare IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  Konzentrationen auf die Stimulation mit PPD Sensitin, welche, verdeutlicht durch das Sensitin/Tuberculin-Verhältnis (Abb. 3.11c), für jeden Patienten höher lagen, als auf die Stimulation mit PPD Tuberculin (Abb. 3.11a).



**Abb. 3.11) – IFN- $\gamma$  / TNF- $\alpha$  Expression im CBA aus PBMC-Überständen der „NTM-LAP“-Gruppe nach *in vitro* Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen - a) zeigt die gemessenen Konzentrationen [pg/ml] von IFN- $\gamma$  (Kreise) und TNF- $\alpha$  (Quadrate) in PBMC-Überständen aus der „NTM-LAP“-Gruppe (hellgrau; n=3) nach Stimulation mit PPD Tuberculin bzw. PPD Sensitin. Symbole desselben Patienten sind mit geraden Linien verbunden. b) zeigt die entsprechenden Zytokinantworten nach Stimulation mit CD3/28 Dynabeads® (grau) bzw. PMA/Ionomycin (schwarz) als Positivkontrollen. Die waagerechten, gestrichelten Linien zeigen das untere Detektionslimit (IFN- $\gamma$ : 15,84 pg/ml / TNF- $\alpha$ : 17,52 pg/ml) des jeweiligen Assays. Die durchgezogenen, waagerechten Linien zeigen jeweils den Median. Jedes Symbol repräsentiert einen Patienten. Symbole desselben Patienten sind mit geraden Linien verbunden. c) zeigt die Sensitin/Tuberculin-Verhältnisse (*Ratios*) der einzelnen Zytokinantworten. Jedes Symbol zeigt das *Ratio* für einen Patienten. Die durchgezogene waagerechte Linie markiert den Indifferenzpunkt 1.**

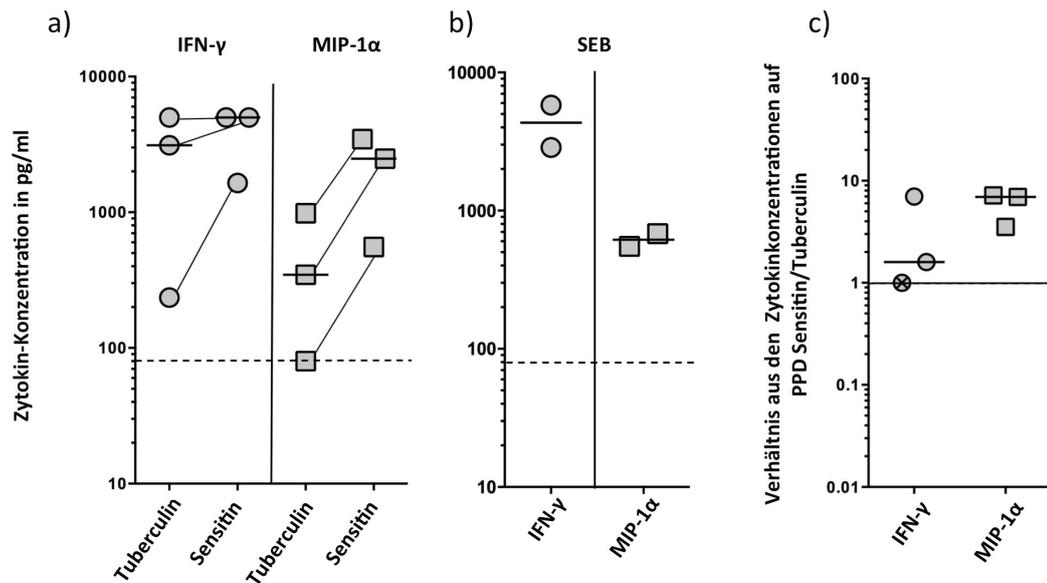
Für die Analyse von IP-10 musste wieder auf die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) als Surrogatparameter zurückgegriffen werden, da durch eine fehlerhafte Standardkurve die semi-quantitative Bestimmung der Zytokin-Konzentration nicht möglich war. Dementsprechend war die Festlegung eines Detektionslimits für die gemessenen Werte nicht möglich. Die Untersuchung von Vollblutüberständen zeigte sich für die „NTM-LAP“-Gruppe eine relativ schwache IP-10-Expression mit größtenteils indifferenten Reaktionen auf PPD Sensitin und PPD Tuberculin (Abb. 3.12b). Dies zeigt sich ebenfalls in den entsprechenden Sensitin/Tuberculin-Verhältnissen (Abb. 3.12c). In den PBMC-Überständen ließen sich generell nur sehr geringe Konzentrationen von IP-10 messen (Abb. 3.12d+e). In den PBMC-Überständen zeigte sich nur für Patient D eine geringe IP-10 Induktion (Abb. 3.12d).



**Abb. 3.12) – IP-10 Expression der „NTM-LAP“-Gruppe im CBA nach *in vitro* Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen** - a) zeigt die gemessenen MFI-Werte für die „NTM-LAP“-Gruppe (hellgrau; n=3) nach Stimulation im Vollblut mit PPD Tuberculin und PPD Sensitin. Symbole desselben Patienten sind mit geraden Linien verbunden. b) zeigt die MFI-Werte für IP-10 nach SEB-Stimulation im Vollblut als Positivkontrolle. Die durchgezogenen, waagerechten Linien zeigen jeweils den Median. Jedes Symbol repräsentiert einen Patienten. c) zeigt die Verhältnisse (*Ratios*) der einzelnen Zytokinantworten auf PPD Sensitin und PPD Tuberculin (Sensitin/Tuberculin). Jedes Symbol zeigt das *Ratio* für einen Patienten. Die durchgezogene waagerechte Linie markiert den Indifferenzpunkt 1. d) zeigt die gemessenen MFI-Werte für die „NTM-LAP“-Gruppe nach Stimulation in PBMC-Überständen (dunkelgrau; n=3) mit PPD Tuberculin und PPD Sensitin. e) zeigt die MFI-Werte für IP-10 in PBMC-Überständen nach Stimulation mit CD3/28 (Dreieck) bzw. PMA/Ionomycin (Quadrat) als Positivkontrolle. Die durchgezogenen, waagerechten Linien zeigen jeweils den Median.

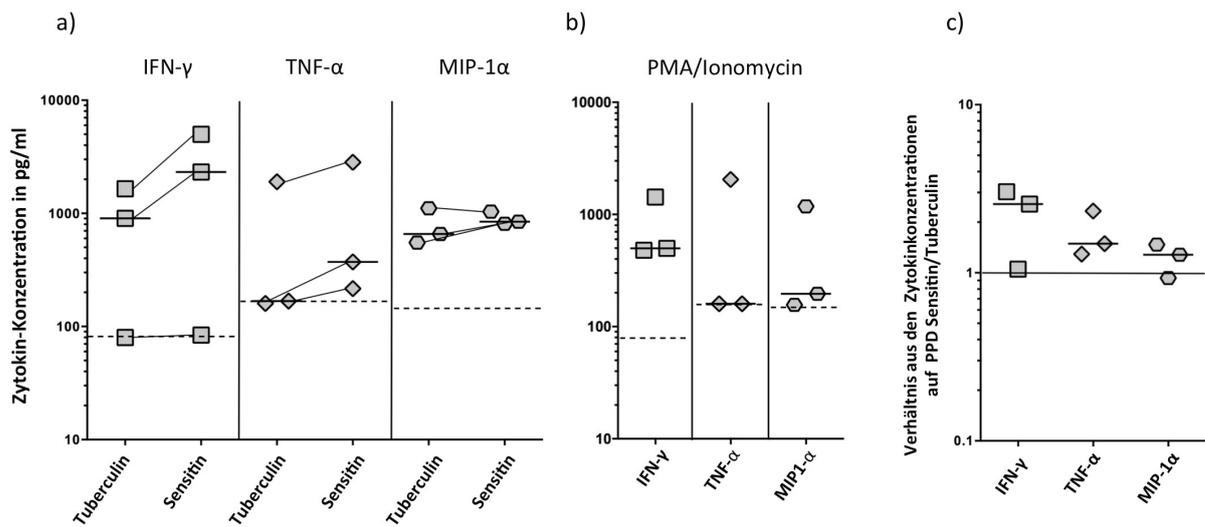
### 3.2.3 Zytokinanalysen in bestätigten NTM-Infektionen im ELISA

In der „NTM-LAP“-Gruppe (n=3) zeigte sich sowohl für IFN- $\gamma$ , als auch MIP-1 $\alpha$  eine starke Expression auf den Stimulus mit PPD Sensitin (Abb. 3.13a). Für MIP-1 $\alpha$  zeigte sich eine Dominanz der Reaktion auf PPD Sensitin gegenüber der Reaktion auf PPD Tuberculin, was auch an den jeweiligen Sensitin/Tuberculin-Verhältnissen  $>1$  (Abb. 3.13c) gezeigt werden konnte. In Fall von IFN- $\gamma$  zeigten die Patienten B und D eine Sensitin-dominante Zytokinexpression. Für Patient C wurden sowohl auf PPD Sensitin, als auf PPD Tuberculin IFN- $\gamma$  Konzentrationen gemessen, welche außerhalb des Detektionslimits des Assays (5000 pg/ml) lagen. Daher verliert der Sensitin/Tuberculin-Verhältnis = 1 (Abb. 3.13c; mit Kreuz markiert) seine Aussagekraft. Für die Analysen im ELISA wurden dieselben stimulierten Vollblut-Überstände untersucht, wie bereits im CBA. Als Konsequenz lagen für den ELISA ebenfalls nur für eine Minderheit der Patienten mit SEB unspezifisch stimulierte Proben als Positivkontrolle für das Assay vor (Abb. 3.13b).



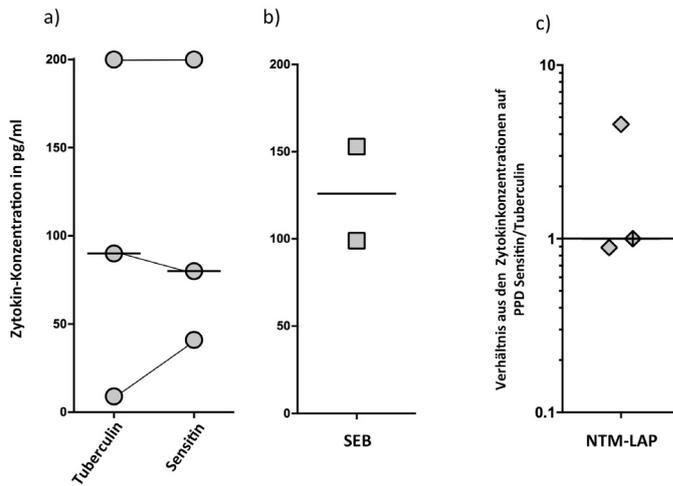
**Abb. 3.13) - IFN- $\gamma$  / MIP-1 $\alpha$  Expressionsmuster der „NTM-LAP“-Gruppe im ELISA aus Vollblutproben nach *in vitro* Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen** - a) zeigt die Konzentrationen von IFN- $\gamma$  (Kreise) und MIP-1 $\alpha$  (Quadrate) nach Stimulation mit PPD Sensetin und PPD Tuberculin für die „NTM-LAP“-Gruppe (hellgrau; n=3). Die Linien verbinden die jeweiligen Zytokinreaktionen desselben Patienten. b) zeigt die entsprechenden Zytokinantworten nach Stimulation mit SEB als Positivkontrolle. Die durchgehende waagerechte Linie repräsentiert jeweils den Median. Die gestrichelte waagerechte Linie repräsentiert das untere Detektionslimit der Assays (80 pg/ml). c) zeigt die Sensitin/Tuberculin-Verhältnis (*Ratios*) der einzelnen Patienten. Die waagerechte Linie markiert den Indifferenz-Wert 1.

Abbildung 3.14a zeigt die gemessenen Konzentrationen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und MIP-1 $\alpha$  in PBMC-Überständen nach Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen für die „NTM-LAP“-Gruppe (n=3). Es zeigte sich eine zuverlässige, sensitin-dominante IFN- $\gamma$  Expression für zwei der drei Patienten. Für Patient B verbleiben die gemessenen IFN- $\gamma$  Konzentrationen knapp oberhalb des Detektionslimits, obwohl alle drei Patienten auf den unspezifischen Stimulus SEB in der Positivkontrolle (Abb. 3.14b) ausreichend reagierten. Es zeigte sich nur für Patient D eine deutliche sensitin-dominante TNF- $\alpha$  Expression, während Patienten B und C nur schwache TNF- $\alpha$  Konzentrationen oberhalb des Detektionslimits präsentierten (Abb. 3.14a). Für MIP-1 $\alpha$  demonstrierten alle drei Patienten mittelgradige Expressionen, wobei das Sensitin/Tuberculin-Verhältnis für Patient D < 1 ausfiel (Abb. 3.14c).



**Abb. 3.14) - IFN- $\gamma$  / TNF- $\alpha$  / MIP-1 $\alpha$  Expressionsmuster der „NTM-LAP“-Gruppe im ELISA aus PBMC-Überständen nach *in vitro* Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen - a) zeigt die gemessenen Zytokin-Konzentrationen (pg/ml) von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und MIP-1 $\alpha$  nach *in vitro* Stimulation mit PPD Tuberculin und PPD Sensitin für die „NTM-LAP“-Gruppe (hellgrau; n=3). b) zeigt die entsprechenden Zytokinanworten nach Stimulation mit PMA/Ionomycin als Positivkontrolle. Die gestrichelten waagerechten Linien markieren die Detektionsgrenzen für die jeweiligen Zytokine (IFN- $\gamma$ : 80 pg/ml; TNF- $\alpha$ : 160 pg/ml; MIP-1 $\alpha$ : 156 pg/ml). Kurze waagerechte Linien repräsentieren den Median. c) zeigt die Sensitin/Tuberculin-Verhältnisse der „NTM-LAP“-Gruppe. Die durchgehende waagerechte Linie repräsentiert den Indifferenzwert 1.**

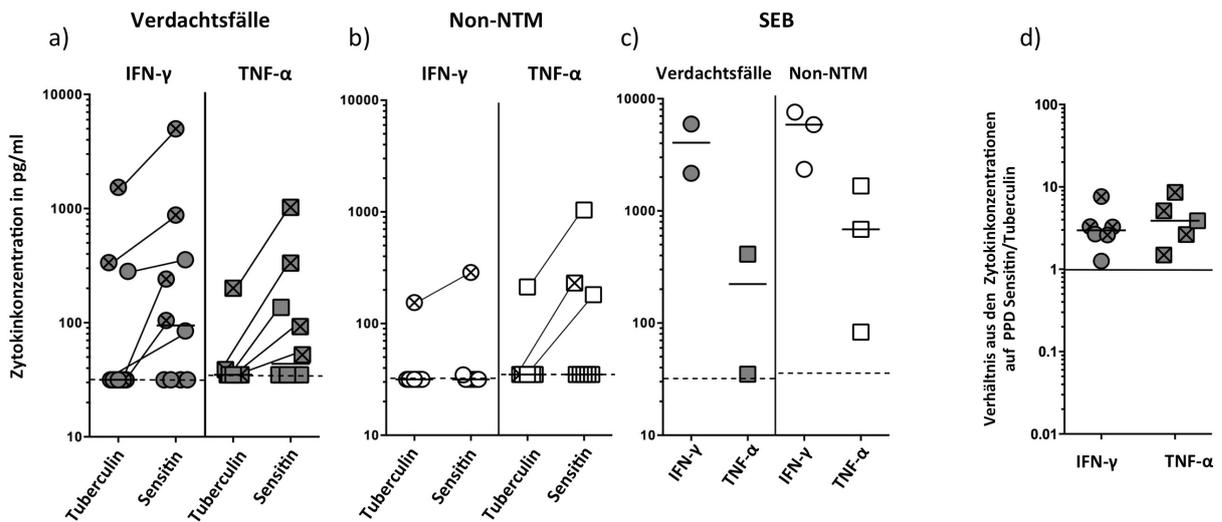
Die Ergebnisse für IP-10 werden hier gesondert dargestellt, da der Detektionsbereich deutlich niedriger und damit geringere Konzentrationen gemessen wurden, als für IFN- $\gamma$  und MIP-1 $\alpha$ , so dass eine gemeinsame Darstellung als nicht sinnvoll erschien. In der „NTM-LAP“-Gruppe (n=3) zeigen alle drei Patienten eine Reaktion auf PPD Sensitin, wobei diese sehr unterschiedlich stark ausfielen (Abb. 3.15a). Die stärkste Reaktion (Patient C) lag, sowohl für PPD Tuberculin, als für PPD Sensitin, außerhalb des Detektionsbereichs der ELISA. Entsprechend verlor das Sensitin/Tuberculin-Verhältnis seine Aussagekraft (Abb. 3.15e; mit Kreuz markiert). Patient D präsentierte eine gute Reaktionsstärke auf beide Antigene, allerdings mit einem Sensitin/Tuberculin-Verhältnis < 1. Patient B demonstrierte eine schwache, sensitin-dominante IP-10 Expression.



**Abb. 3.15) - IP-10 Expression der „NTM-LAP“-Gruppe im ELISA aus Vollblutproben nach *in vitro* Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen** - a) zeigt die im ELISA gemessenen Konzentrationen für IP-10 (pg/ml) in stimulierten Vollblut-Proben aus der „NTM-LAP“-Gruppe nach Stimulation mit PPD Tuberculin bzw. PPD Sensitin). b) zeigt die entsprechend gemessenen Konzentrationen nach Stimulation mit SEB als Positivkontrolle. Die durchgezogenen, waagerechten Linien zeigen jeweils den Median. Symbole desselben Patienten sind mit geraden Linien verbunden. c) zeigt die Sensitin/Tuberculin-Verhältnisse der einzelnen Patienten für „NTM-LAP“-Gruppe. Die waagerechte Linie markiert den Indifferenz-Wert 1.

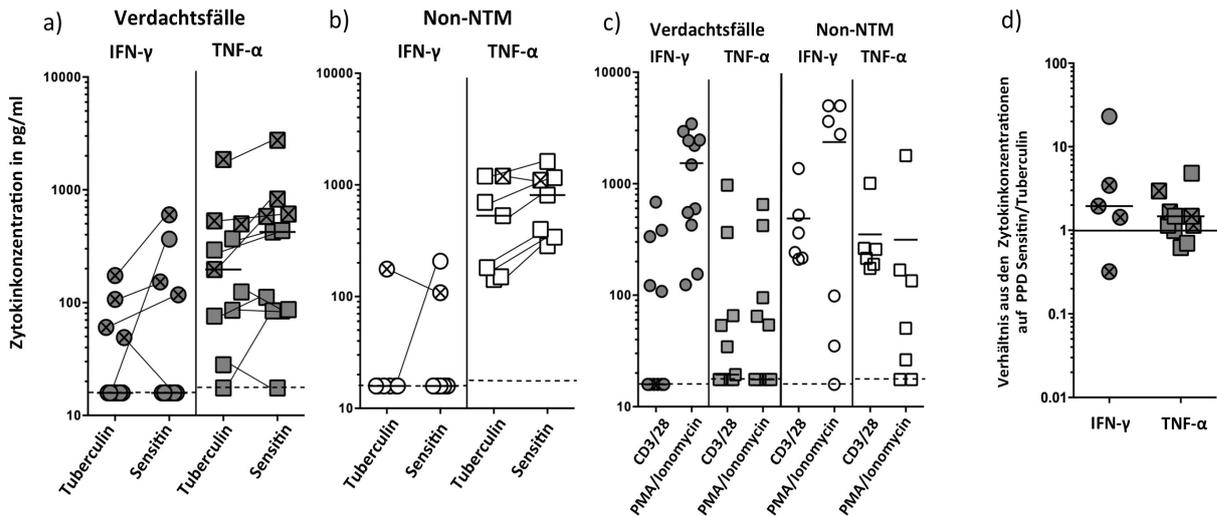
### 3.2.4 Zytokinanalysen in LAP unklarer & nicht-mycobakterieller Ätiologie im CBA

In den CBA-Vollblut-Analysen der „Verdachtsfälle“ (n=10) zeigten 6 Patienten deutlich messbare IFN- $\gamma$  Konzentrationen auf die Stimulation mit PPD Sensitin (Abb. 3.16a). Die IFN- $\gamma$  Konzentrationen auf PPD Tuberculin fielen für jeden Patienten geringer aus als bei PPD Sensitin. Dies zeigt sich an den Sensitin/Tuberculin-Verhältnissen der Zytokinkonzentrationen für die einzelnen Patienten (Abb. 3.16b). Vier der genannten Patienten (Patienten N, R, T, U) hatten bereits alle in den ICS-Versuchen starke Zytokinreaktionen demonstriert (mit Kreuz markiert). Für Patient Q lagen keine durchfluss-zytometrischen Daten vor, so dass ein Vergleich zu den ICS-Versuchen hier nicht möglich war. Patient O zeigte weder in den vorherigen ICS-Kurzzeit-, noch in den Langzeit-Stimulationsversuchen eine Zytokinreaktion. Für TNF- $\alpha$  zeigten 5 Patienten ein sehr ähnliches Muster mit Konzentrationsverhältnissen, wie für IFN- $\gamma$ . Die Patienten N, R, T und U waren ebenfalls darunter. Der verbleibende reaktive Patient (P) war wiederum ein weiterer Patient für den keine durchfluss-zytometrischen Daten aus den ICS-Versuchen vorlagen. In der „Non-NTM-LAP“-Gruppe (n=8) ließen sich keine relevanten IFN- $\gamma$ -Konzentration messen, mit Ausnahme von Patient K (Abb. 3.16b; mit Kreuz markiert), der auf beide Antigene eine Reaktion zeigte. Patient K hatte bereits im Langzeit-Stimulationsversuch eine Zytokinantwort demonstriert. Für TNF- $\alpha$  zeigt Patient K (mit Kreuz markiert), neben 2 weiteren Patienten (Patienten F + J) ebenfalls eine deutlich messbare Zytokinexpression auf PPD Sensitin (Abb. 3.16b). Alle weiteren Patienten dieser Gruppe zeigen keine messbaren TNF- $\alpha$  Konzentrationen.



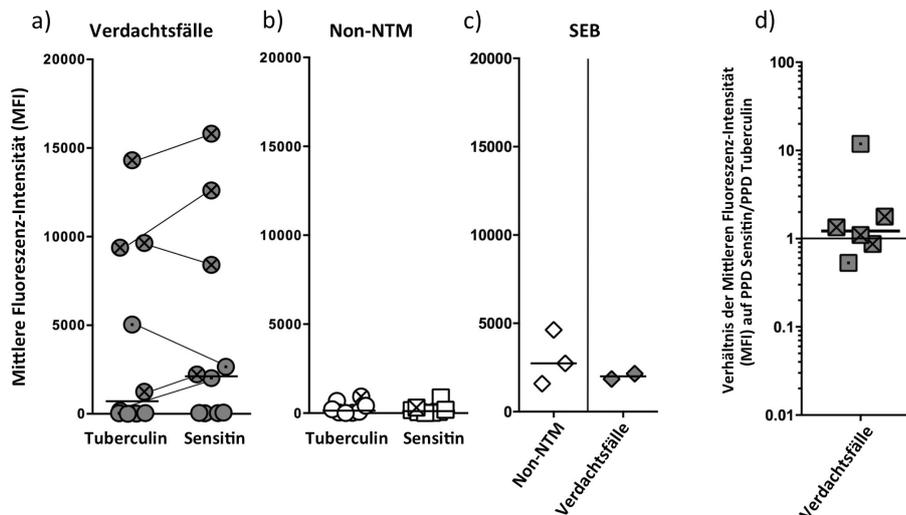
**Abb. 3.16) - IFN- $\gamma$  / TNF- $\alpha$  Expression der „Verdachtsfälle“ und „Non-NTM-LAP“- Gruppe im CBA aus Vollblutproben nach *in vitro* Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen - a) zeigt die gemessenen Konzentrationen [pg/ml] von IFN- $\gamma$  (Kreise) und TNF- $\alpha$  (Quadrate) aus der Gruppe der Verdachtsfälle (dunkelgraue Symbole; n=10) nach Stimulation mit PPD Tuberculin bzw. PPD Sensitin. b) zeigt die entsprechenden Zytokinantworten der „Non-NTM-LAP“-Gruppe (weiße Symbole; n=8). c) zeigt die entsprechenden Zytokinantworten nach Stimulation mit SEB als Positivkontrolle. Die waagerechten, gestrichelten Linien zeigen das untere Detektionslimit (IFN- $\gamma$ : 31,68 pg/ml / TNF- $\alpha$ : 35,04 pg/ml) des jeweiligen Assays. Patienten, die bereits in den ICS-Versuchen reagiert haben, sind mit einem Kreuz markiert. Die durchgezogenen, waagerechten Linien zeigen jeweils den Median. Symbole desselben Patienten sind mit geraden Linien verbunden. d) zeigt die Verhältnisse (*Ratios*) der einzelnen Zytokinantworten auf PPD Sensitin und PPD Tuberculin (Sensitin/Tuberculin) der reaktiven Patienten aus der Gruppe der Verdachtsfälle. Jedes Symbol zeigt das Verhältnis für einen Patienten. Die durchgezogene waagerechte Linie markiert den Indifferenzpunkt 1.**

In der Stimulation in PMBC-Überständen demonstriert die Gruppe der “Verdachtsfälle“ (n=11) für die Patienten N, T, U, und Y deutlich messbare IFN- $\gamma$ -Konzentrationen auf PPD Sensitin (Abb. 3.17a). Von diesen drei Patienten demonstrierten alle, analog zu den Vorversuchen einem Sensitin/Tuberculin-Verhältnis > 1 (Abb. 3.17b). Patient R (ebenfalls mit Kreuz markiert), der zuvor zuverlässig auf beide Antigene eine IFN- $\gamma$  Expression gezeigt hatte, reagiert hier lediglich auf PPD Tuberculin (Abb. 3.17a+d). Für TNF- $\alpha$  zeigten alle Patienten der Gruppe eine TNF- $\alpha$  Expression oberhalb des Detektionslimits (Abb. 3.17a). Die Bildung des Sensitin/Tuberculin-Verhältnisses trägt ebenfalls nicht zur weiteren Diskriminierung bei (Abb 3.17d). In der Gruppe der „Non-NTM-LAP“-Gruppe (n=7) zeigten sich wieder relevante IFN- $\gamma$ -Konzentrationen für Patient K (Abb. 3.17b; mit Kreuz markiert), der schon in den Vollblut-Analysen (Kapitel 3.2.1), sowie in den Langzeit-Stimulationsversuchen (Kapitel 3.1.2) eine Reaktion auf mycobakterielle Antigene gezeigt hatten. Anders als vorher fiel diesmal die Reaktion auf PPD Tuberculin stärker aus, als auf PPD Sensitin. Daneben zeigt sich Patient L mit einer Zytokinreaktion auf PPD Sensitin, der bisher nur in der ICS-Kurzzeit-Stimulation aufgefallen war. Sehr auffällig sind die gemessenen Konzentrationen für TNF- $\alpha$  in dieser Gruppe mit Zytokinreaktionen weit über dem Detektionslimit in allen Fällen (Abb. 3.17b).



**Abb. 3.17) - IFN- $\gamma$  / TNF- $\alpha$  Expression der „Verdachtsfälle“ und „Non-NTM-LAP“- Gruppe im CBA aus PBMC-Überständen nach *in vitro* Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen - a) zeigt die gemessenen Konzentrationen [pg/ml] von IFN- $\gamma$  (Kreise) und TNF- $\alpha$  (Quadrate) aus der Gruppe der Verdachtsfälle (dunkelgraue Symbole; n=11) nach Stimulation mit PPD Tuberculin bzw. PPD Sensitin. b) zeigt die entsprechenden Zytokinantworten der „Non-NTM-LAP“-Gruppe (weiße Symbole; n=7). c) zeigt die entsprechenden Zytokinantworten nach Stimulation mit CD3/28 bzw. PMA/Ionomycin als Positivkontrolle. Die waagerechten, gestrichelten Linien zeigen das untere Detektionslimit (IFN- $\gamma$ : 15,84 pg/ml / TNF- $\alpha$ : 17,52 pg/ml) des jeweiligen Assays. Patienten, die bereits in den ICS-Versuchen reagiert haben, sind mit einem Kreuz markiert. Die durchgezogenen, waagerechten Linien zeigen jeweils den Median. Jedes Symbol repräsentiert einen Patienten. Symbole desselben Patienten sind mit geraden Linien verbunden. d) zeigt die Verhältnisse (*Ratios*) der einzelnen Zytokinantworten auf PPD Sensitin und PPD Tuberculin (Sensitin/Tuberculin) der reaktiven Patienten aus der Gruppe der Verdachtsfälle. Jedes Symbol zeigt das Verhältnis für einen Patienten. Die durchgezogene waagerechte Linie markiert den Indifferenzpunkt 1.**

Für IP-10 demonstrierte die „Non-NTM-LAP“-Gruppe minimale IP-10 Expressionen (Abb. 3.18c), wohingegen die Gruppe der „Verdachtsfälle“ mit einer z.T. deutlichen Expression auffiel (Abb. 3.18a). Patienten N, R, T und U waren ebenfalls darunter (mit Kreuz markiert). Patienten N, R und U zeigten sich mit sehr hohen MFI-Werten; Patient T mit einer sehr schwachen Ausprägung. Patient N zeigte eine stärkere Reaktion auf PPD Tuberculin. Daneben zeigten zwei weitere Patienten (Patienten O + Q) eine Reaktion auf PPD Sensitin, welche bereits in den CBA Vollblut-Messungen für IFN- $\gamma$ , aber nicht in den ICS-Versuchen reaktiv aufgefallen waren (mit Punkt markiert). Patient Q weist ebenfalls eine Sensitin/Tuberculin-*Ratio* < 1 auf. Durch die bereits genannten Probleme bzgl. der Positivkontrollen in den Vollblut-Stimulationsansätzen liegen für IP-10 ebenfalls nur für eine Minderheit der Patienten Daten vor Abb. 3.18c).

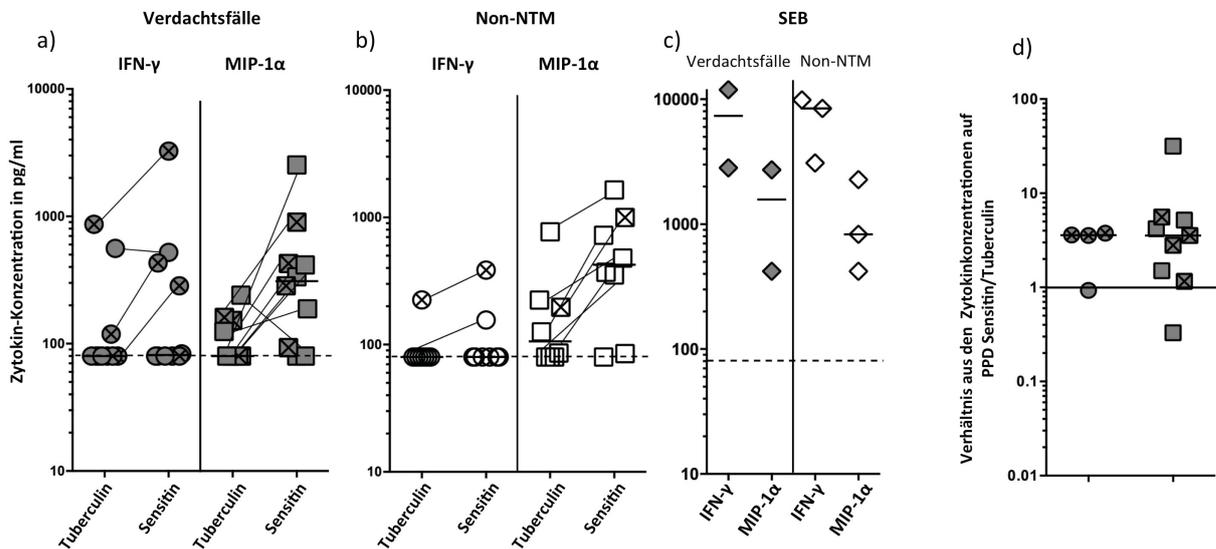


**Abb. 3.18) – IP-10 Expression der „Verdachtsfälle“ und „Non-NTM-LAP“- Gruppe im CBA aus Vollblutproben nach *in vitro* Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen.** a) zeigt die gemessenen Fluoreszenz-Werte (MFI) für IP-10 aus der Gruppe der „Verdachtsfälle“ (dunkelgraue Symbole; n=11) nach Stimulation mit PPD Tuberculin bzw. PPD Sensitin. b) zeigt die entsprechend gemessenen MFI-Werte für die „Non-NTM-LAP“-Gruppe (weiße Symbole; n=7). Patienten, die bereits in den ICS-Versuchen reagiert haben, sind mit einem Kreuz markiert. Patienten, die in den CBA-Vollblut-Versuchen, aber nicht in den ICS-Versuchen reagiert haben, sind mit einem Punkt markiert. Symbole desselben Patienten sind mit geraden Linien verbunden. c) zeigt die MFI-Werte für IP-10 nach Stimulation mit SEB als Positivkontrolle. Die durchgezogenen, waagerechten Linien zeigen jeweils den Median. e) zeigt die Verhältnisse (*Ratios*) der einzelnen Zytokinantworten auf PPD Sensitin und PPD Tuberculin (Sensitin/Tuberculin) der reaktiven Patienten aus der Gruppe der Verdachtsfälle (dunkelgrau). Die durchgezogene waagerechte Linie markiert den Indifferenzpunkt 1.

### 3.2.5 Zytokinanalysen in LAP unklarer & nicht-mycobakterieller Ätiologie im ELISA

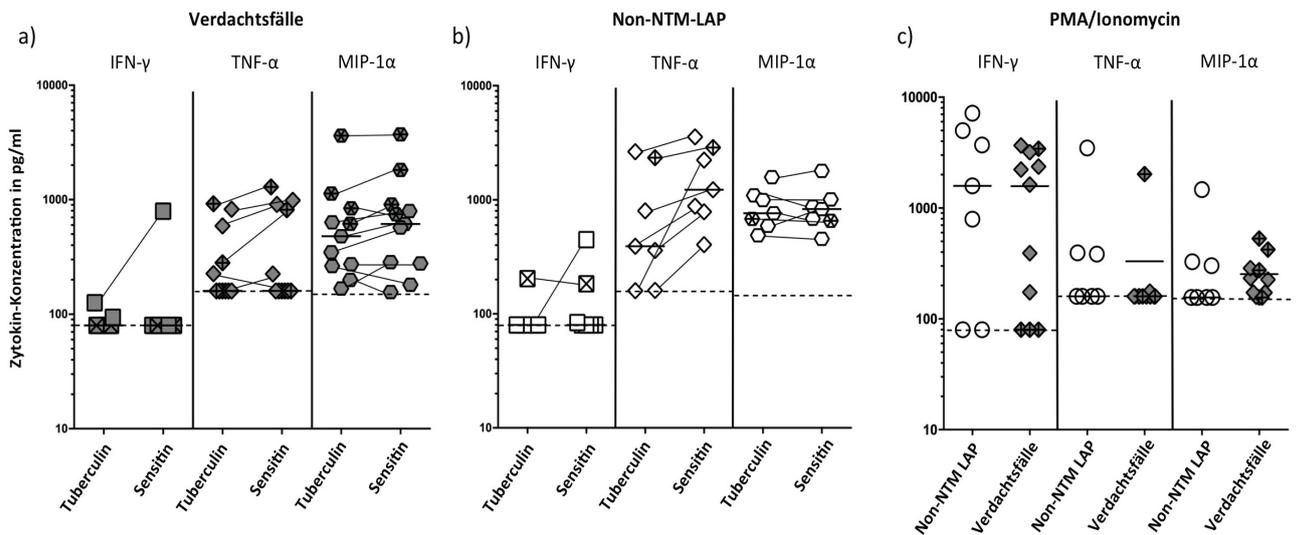
Im ELISA zeigen sich in der Gruppe der „Verdachtsfälle“ (n=10) für IFN- $\gamma$  vier Patienten (u.a. Patienten N, R, U; mit Kreuz markiert) mit einer relevanten Expression auf PPD Sensitin (Abb. 3.19a). Patient Q war bisher nur in den CBA-Analysen im Vollblut mit einer relevanten IFN- $\gamma$ -Expression aufgefallen. Anders als dort, zeigte Patient Q hier eine minimal stärkere Expression auf PPD Tuberculin, als PPD Sensitin. Entsprechend zeigte sich das Sensitin/Tuberculin-Verhältnis < 1 (Abb. 3.19d). Für MIP-1 $\alpha$  zeigen sich neben den Patienten N, R, T & U (mit Kreuz markiert), vier weitere Patienten (Patienten P, Q, V, Y) mit deutlicher sensitin-dominanter MIP-1 $\alpha$ -Expression (Abb. 3.19a). Patient S fällt mit einer tuberculin-dominanten MIP-1 $\alpha$ -Expression auf. In der „Non-NTM-LAP“-Gruppe (n=8) zeigten sich für IFN- $\gamma$  zwei PPD Sensitin-dominante Patienten (Patienten K+L), die eine schwache Expression oberhalb des Detektionslimits demonstrieren (Abb. 3.19b). Patient K war bereits in den CBA-Analysen auffällig geworden (mit Kreuz markiert). MIP-1 $\alpha$  scheint allerdings auf die Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen im Vollblut unspezifisch induziert zu werden, was sich an den relativ starken, sensitin-dominanten

Expressionsmustern in Patienten aus der „Non-NTM-LAP“-Gruppe (Abbildung 3.19b) erkennen lässt.



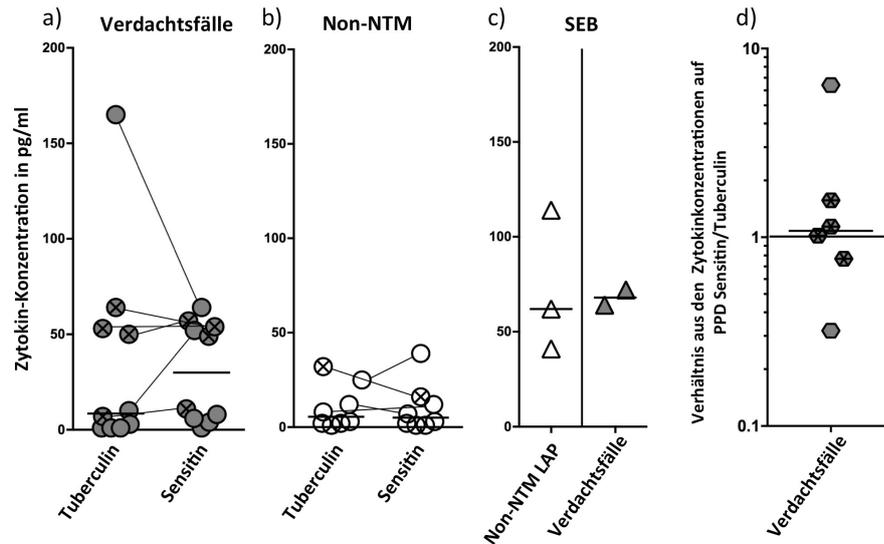
**Abb. 3.19) - IFN- $\gamma$  / MIP-1 $\alpha$  Expression der „Verdachtsfälle“ und „Non-NTM-LAP“- Gruppe im ELISA aus Vollblutproben nach *in vitro* Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen** – a) zeigt die Konzentrationen von IFN- $\gamma$  und MIP-1 $\alpha$  nach Stimulation mit PPD Sensitin und PPD Tuberculin für die Gruppe der „Verdachtsfälle“ (dunkelgrau; n=10). b) zeigt die entsprechenden Zytokinantworten für die „Non-NTM-LAP“-Gruppe (weiß; n=8). c) zeigt sich entsprechenden Zytokinantworten nach Stimulation mit SEB als Positivkontrolle. Die Linien verbinden die jeweiligen Zytokinreaktionen eines Patienten auf die beiden mycobakteriellen Antigene. Patienten, die bereits in den ICS-Versuchen reagiert haben, sind mit einem Kreuz markiert. Die durchgehende waagerechte Linie repräsentiert jeweils den Median. Die gestrichelte waagerechte Linie repräsentiert das untere Detektionslimit der Assays für die jeweiligen Zytokine (für beide: 80 pg/ml). b) zeigt die Sensitin/Tuberculin-Verhältnisse der einzelnen Patienten für IFN- $\gamma$  (Kreis) und MIP-1 $\alpha$  (Quadrat). Die waagerechte Linie markiert den Indifferenz-Wert 1.

Abbildung 3.20a zeigt die gemessenen Zytokin-Konzentrationen in PBMC-Überständen für die Gruppe der Verdachtsfälle (n=11). Für IFN- $\gamma$  zeigte sich, bis auf eine Ausnahme (Patient Y), keine einzige Messung oberhalb des Detektionslimits; auch wenn die Positivkontrolle eine generelle Induzierbarkeit von IFN- $\gamma$  für die Gruppe der Verdachtsfälle demonstriert hatte (Abb. 3.20c). Für TNF- $\alpha$  zeigten sich die Patienten S, T, U und Y mit sensitin-dominantem Expressionsmuster (Abb. 3.20a). Für MIP-1 $\alpha$  zeigt sich für nahezu alle Patienten eine messbare Zytokinreaktion oberhalb des Detektionslimits (Abb. 3.20a). In der „Non-NTM-LAP“-Gruppe (n=7) zeigten sich für IFN- $\gamma$  wieder die Patienten K und L mit einer relevanten Expression (Abb. 3.20b). In den Fällen von TNF- $\alpha$  und MIP-1 $\alpha$  hingegen demonstrieren alle Patienten eine Zytokin-Expression auf beide mycobakterielle Antigene (Abb. 3.20b).



**Abb. 3.20) - IFN- $\gamma$  / TNF- $\alpha$  / MIP-1 $\alpha$  Expressionsmuster der „Non-NTM-LAP“-Gruppe und Gruppe der „Verdachtsfälle“ im ELISA aus PBMC-Überständen nach *in vitro* Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen - a) zeigt die gemessenen Zytokinkonzentrationen (pg/ml) von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und MIP-1 $\alpha$  nach *in vitro* Stimulation mit PPD Tuberculin und PPD Sensitin für die Gruppe der „Verdachtsfälle“ (dunkelgrau; n=11). b) zeigt die entsprechenden Zytokinantworten für die „Non-NTM-LAP“-Gruppe (weiß; n=7). c) zeigt die entsprechenden Zytokinantworten nach Stimulation mit PMA/Ionomycin als Positivkontrolle. Patienten, die bereits in den ICS-Versuchen reagiert haben, sind mit einem Kreuz markiert. Die gestrichelten waagerechten Linien markieren die Detektionsgrenzen für die jeweiligen Zytokine (IFN- $\gamma$ : 80 pg/ml; TNF- $\alpha$ : 160 pg/ml; MIP-1 $\alpha$ : 156 pg/ml). Kurze waagerechte Linien repräsentieren den Median.**

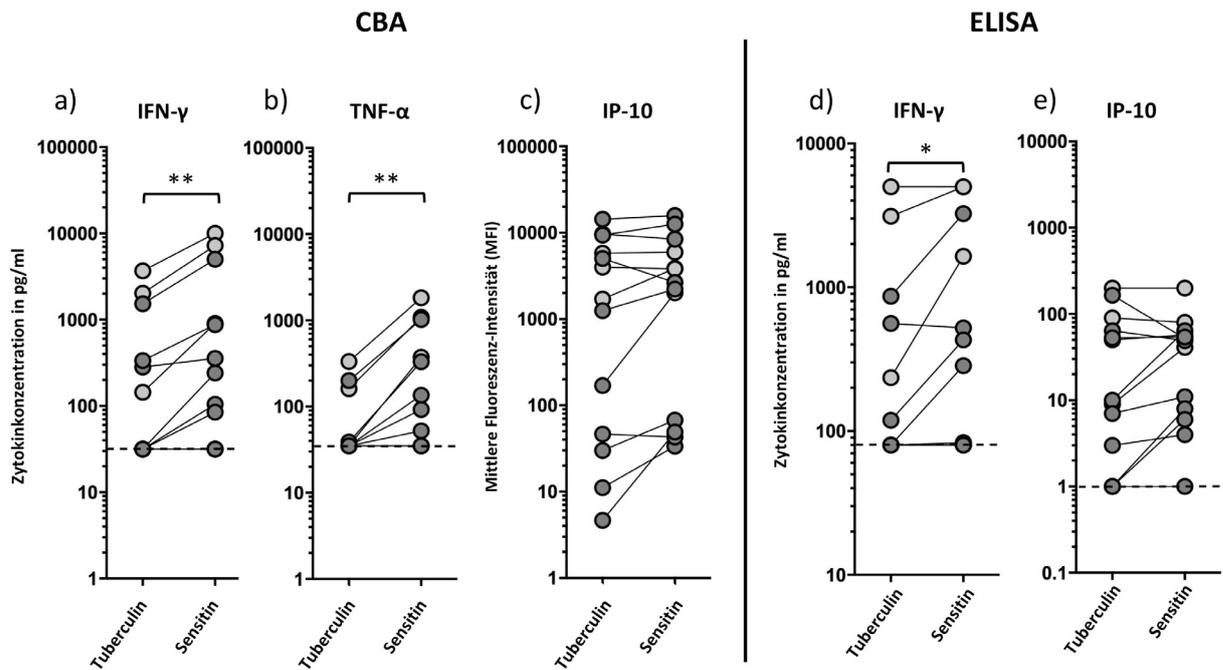
Für IP-10 im ELISA zeigen in der Gruppe der Verdachtsfälle (n=10) insgesamt fünf Patienten mit deutlich messbaren Konzentrationen (Abb. 3.21a). Die Sensitin/Tuberculin-Verhältnisse zeigte allerdings nur für Patient N eine sensitin-dominante IP-10 Expression (Abb. 3.21d). Patient U demonstrierte ein Sensitin/Tuberculin-Verhältnis von knapp > 1, während Patient R eine tuberculin-dominante IP-10 Expression präsentierte. Patient T zeigte in diesem Versuch nur eine marginale IP-10 Expression (Abb. 3.21c). Die beiden verbleibenden Patienten präsentierten mit einer ausgeprägten tuberculin-dominanten (Patient Q) und einer sensitin-dominanten (Patient O) IP-10 Expression, sehr gegensätzliche Expressionsmuster. In der „Non-NTM-LAP“-Gruppe (n=8) zeigten sich neben geringen unspezifischen IP-10 Expressionen zwei Patienten (Patienten E + K) mit messbaren Antworten auf die Exposition mit mycobakteriellen Antigenen (Abb. 3.21b). Patient K zeigte erneut eine PPD Tuberculin-dominante IP-10 Expression, welche bereits in allen Vollblut-Messungen, sowohl im CBA als auch im ELISA mit Zytokin-Expressionen aufgefallen war (mit Kreuz markiert).



**Abbildung 3.21) - IP-10 Expression der „Verdachtsfälle“ und „Non-NTM-LAP“- Gruppe im ELISA aus Vollblutproben nach *in vitro* Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen** - a) zeigt die im ELISA gemessenen Konzentrationen für IP-10 (pg/ml) der Gruppe der „Verdachtsfälle“ (dunkelgrau; n=10) nach Stimulation mit PPD Tuberculin bzw. PPD Sensitin. b) zeigt die entsprechend gemessenen Konzentrationen (pg/ml) für die „Non-NTM-LAP“-Gruppe (weiß; n=8). Patienten, die bereits in den ICS-Versuchen reagiert haben, sind mit einem Kreuz markiert. Die durchgezogenen, waagerechten Linien zeigen jeweils den Median. Jedes Symbol repräsentiert einen Patienten. Symbole desselben Patienten sind mit geraden Linien verbunden. c) zeigt die gemessenen IP-10-Konzentrationen nach SEB als Positivkontrolle. e) zeigt die Sensitin/Tuberculin-Verhältnisse für die reaktiven Patienten aus der Gruppe der Verdachtsfälle. Die waagerechte Linie markiert den Indifferenz-Wert 1.

### 3.2.6 Komparative Analysen der Daten aus CBA und ELISA

Fasst man die „NTM-LAP“-Gruppe und der Gruppe der Verdachtsfälle zusammen und vergleicht die jeweiligen Zytokinantworten aus den Vollblutproben im CBA auf PPD Tuberculin und PPD Sensitin, zeigten sich, sowohl für IFN- $\gamma$  (\* $p=0.004$ ; zweiseitig getestet), als auch für TNF- $\alpha$  (\*\* $p=0.008$ ; zweiseitig getestet) signifikant stärkere Zytokinantworten auf die Stimulation mit PPD Sensitin (s. Abb. 3.22a+b). Für die IP-10 Konzentrationen im Vollblut zeigten sich im CBA keine signifikanten Unterschiede nach der Stimulation mit PPD Tuberculin oder PPD Sensitin (Abb. 3.22c). Im ELISA zeigten sich ebenfalls signifikant höhere IFN- $\gamma$  Konzentrationen nach Stimulation mit PPD Sensitin (Abb. 3.22d;  $p<0.05$ ; zweiseitig getestet). Die IP-10 Konzentrationen zeigten im ELISA analog zum CBA keinen signifikanten Unterschied nach der Stimulation mit PPD Tuberculin oder PPD Sensitin (Abb. 3.22e).

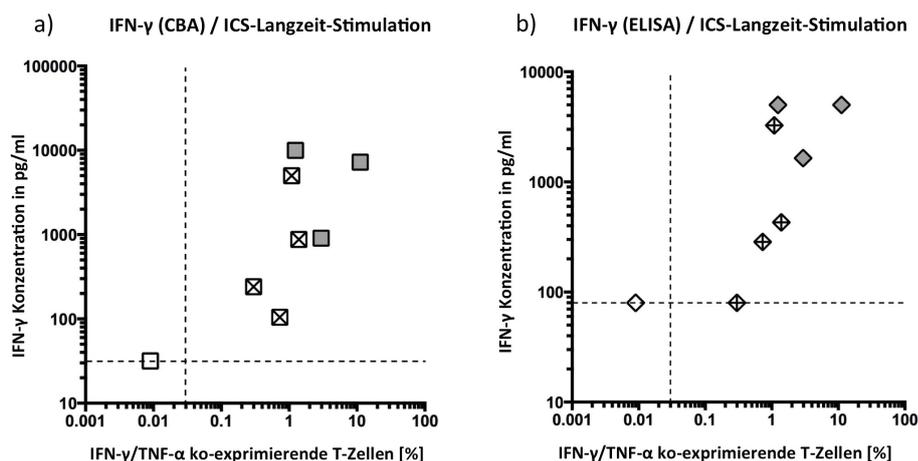


**Abb. 3.22) – Gegenüberstellung der Zytokinreaktion im Vollblut auf PPD Tuberculin und PPD Sensitin im CBA und ELISA.**

a) zeigt die IFN- $\gamma$  Konzentrationen (pg/ml) der „NTM-LAP“-Gruppe (hellgrau) und der Gruppe der Verdachtsfälle (dunkelgrau) im CBA nach Stimulation mit PPD Tuberculin und PPD Sensitin im Vergleich. b) zeigt die entsprechenden Konzentrationen (pg/ml) für TNF- $\alpha$  und c) die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) für IP-10 im CBA nach Stimulation mit PPD Tuberculin und PPD Sensitin im Vergleich. d) und e) zeigen die entsprechenden Konzentrationen [pg/ml] für IFN- $\gamma$  und IP-10 aus den Messungen im ELISA. Die waagerechten, gestrichelten Linien zeigen das untere Detektionslimit (CBA: 31,68 pg/ml für IFN- $\gamma$  / 35,04 pg/ml für TNF- $\alpha$ ; ELISA: 80 pg/ml für IFN- $\gamma$  / 1 pg/ml für IP-10) des jeweiligen Assays. Symbole desselben Patienten sind mit geraden Linien verbunden. Signifikante Unterschiede im Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon sind, wie folgt markiert: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (zweiseitig getestet).

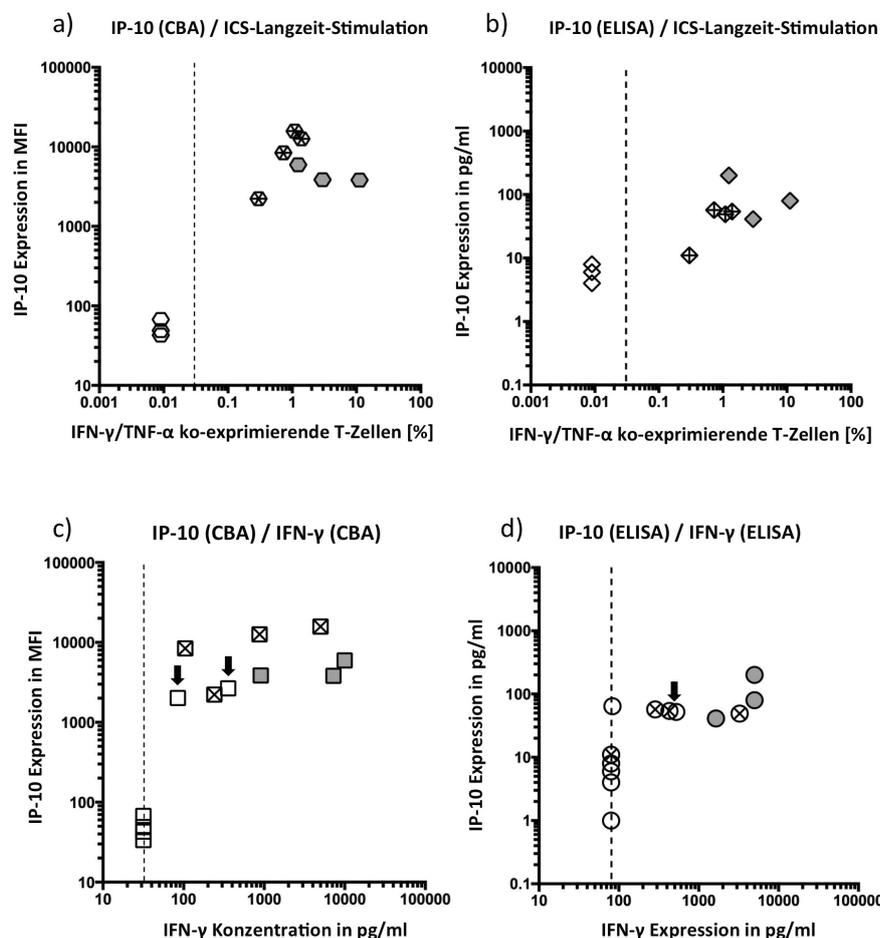
In Kapitel 3.1.3 konnte über den Exakten Test nach Fisher bereits gezeigt werden, dass sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer positiven Zytokinantwort im Sinne von IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ko-exprimierenden T-Zellen oberhalb des Detektionslimits in der Durchflusszytometrie und der Zugehörigkeit zur zusammengefassten Gruppe „NTM-LAP/Verdachtsfälle“ besteht. Wendet man den Exakten Test nach Fisher auf die durchgeführten Analysen im CBA und ELISA an und definiert eine positive Zytokinantwort als gemessene Zytokinkonzentration oberhalb des Detektionslimits, zeigt sich lediglich im CBA für IFN- $\gamma$  im Vollblut ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer positiven Zytokinreaktion auf PPD Sensitin und der Zugehörigkeit zur Gruppe „NTM-LAP/Verdachtsfälle“ ( $p=0.02$ ; zweiseitig getestet). In der CBA-Analyse für IP-10 im Vollblut zeigte sich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen einer positiven Zytokinreaktion und der Zugehörigkeit zur Gruppe „NTM-LAP/Verdachtsfälle“ ( $p=0.06$ ; zweiseitig getestet). Für die übrigen Assays zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang.

Um weitere Zusammenhänge zwischen den Befunden aus dem CBA, sowie ELISA und den ICS-Stimulationsversuchen zu untersuchen, wurden die Daten der Patienten aus der „NTM-LAP“-Gruppe mit denen der Gruppe der „Verdachtsfälle“ erneut zusammengeführt und in einem Streudiagramm dargestellt. Patienten, für die nur Datenpunkte für einen der beiden Versuche zur Verfügung standen (s. Tab. 3.1), konnten für die Darstellung nicht berücksichtigt werden. Die Aussagekraft der Korrelationen ist daher begrenzt, da so nicht alle Patienten dargestellt werden konnten. Abbildung 3.22a zeigt das Streudiagramm für die Konzentrationen von IFN- $\gamma$  in den Vollblut-Überständen im CBA und den T-Zellreaktionen in den ICS-Langzeit-Stimulationsversuchen. Es zeigt sich ein deutlicher positiver Zusammenhang zwischen den Daten, welcher sich auch in einer signifikanten Korrelation widerspiegelt ( $r=0.85$ ,  $p=0.004$ ; zweiseitig getestet). Abbildung 3.22b zeigt die Gegenüberstellung der im ELISA gemessenen IFN- $\gamma$  Konzentrationen in pg/ml und den Anteil an IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ko-exprimierenden T-Zellen im Durchflusszytometer nach ICS-Langzeit-Stimulation mit PPD Sensitin. Es zeigt sich ein deutlicher positiver Zusammenhang zwischen den Ergebnissen, welches durch eine signifikante Korrelation bestätigt wird ( $r=0.86$ ,  $p=0.0031$ ; zweiseitig getestet). Patienten mit einem hohen Anteil an IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ko-exprimierenden T-Zellen im Durchflusszytometer nach ICS-Langzeit-Stimulation zeigen also sowohl im CBA als auch im ELISA eine hohe IFN- $\gamma$  Konzentration in PPD Sensitin-stimulierten Vollblutproben und umgekehrt.



**Abb. 3.22) Zusammenhänge zwischen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen aus stimulierten Vollblut-Proben im CBA und ELISA und Befunden aus der ICS-Langzeitstimulation.** Gezeigt werden die Gegenüberstellungen der Konzentrationen (pg/ml) für IFN- $\gamma$  im CBA (a) und ELISA (b) mit dem Anteil der IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ko-exprimierenden T-Zellen (%) aus den ICS-Versuchen. Graue Symbole repräsentieren Patienten aus der „NTM-LAP“-Gruppe (n=3). Weiße Symbole repräsentieren die Patienten aus der Gruppe der „Verdachtsfälle“ (n=7). Kreuze markieren Patienten mit starker Reaktion im ICS-Langzeit-Versuch (n=4). Gestrichelte Linien repräsentieren die Detektionsgrenzen für die jeweiligen Assays. Statistische Korrelationen über den Spearman-rho Test ermittelt.

Abbildung 3.23a + b zeigen die Gegenüberstellung der im CBA und ELISA gemessenen IP-10-Konzentrationen mit den T-Zellreaktionen in den ICS-Langzeit-Stimulationsversuchen. Sowohl im CBA, als auch im ELISA zeigen dieselben Patienten ausgeprägte IP-10 Konzentrationen, welche in den ICS-Versuchen mit sensitin-dominanten Zytokinantworten reagiert hatten. Aufgrund der eher schwachen IP-10-Expression der „NTM-LAP“-Gruppe (hellgrau) reicht es statistisch nur für eine tendenzielle Korrelation (Abb. 3.23a;  $r=0.62$ ,  $p=0.06$ ; zweiseitig getestet). In der Gegenüberstellung mit den Daten aus dem ELISA zeigt sich wiederum die signifikante Korrelation ( $r=0.77$ ,  $p=0.014$ ; zweiseitig getestet), die sich in den CBA-Daten schon angedeutet hatte (Abb. 3.23b).



**Abb. 3.23) - Zusammenhänge zwischen Daten aus IP-10-Messungen in PPD Sensitin-stimulierten Vollblut-Überständen im CBA und ELISA mit Daten aus ICS-Versuchen** - a) zeigt die Gegenüberstellung der IP-10-Konzentrationen (in MFI) aus dem CBA mit dem Anteil der IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ko-exprimierenden T-Zellen (%) aus den ICS-Versuchen. b) zeigt die Gegenüberstellung der IP-10-Konzentrationen (in pg/ml) aus dem ELISA mit dem Anteil der IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ko-exprimierenden T-Zellen (%) aus den ICS-Versuchen. c) zeigt die Gegenüberstellung der IP-10-Konzentrationen (in MFI) aus dem CBA mit den IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (in pg/ml) aus dem CBA. d) zeigt die Gegenüberstellung der IP-10-Konzentrationen (in pg/ml) aus dem ELISA mit den IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (in pg/ml) aus dem ELISA. Graue Symbole repräsentieren die Patienten aus der „NTM-LAP“-Gruppe (n=3). Weiße Symbole repräsentieren die Patienten aus der Gruppe der „Verdachtsfälle“ (n=10). Kreuze markieren Patienten mit starker Reaktion im ICS-Langzeit-Versuch. Die Blockpfeile markieren die im Text erwähnten Patienten O & Q. Gestrichelte Linien repräsentieren die Detektionsgrenzen für die jeweiligen Assays [ICS-Versuche: 0,03%; CBA(IFN- $\gamma$ ): 31,68 pg/ml; ELISA (IFN- $\gamma$ ): 80 pg/ml]. Statistische Korrelationen über den Spearman-rho Test ermittelt.

Stellt man nun die Konzentrationen von IFN- $\gamma$  und IP-10 gegenüber zeigen sich ebenfalls signifikante Korrelationen, sowohl für die Messungen im CBA (Abb. 3.23c;  $r=0.80$ ,  $p=0.002$ ; zweiseitig getestet), als auch im ELISA (Abb. 3.23d;  $r=0.78$ ,  $p=0.003$ ; zweiseitig getestet). In Abbildung 3.23c fallen die Patienten O und Q (mit Pfeil markiert) als zusätzliche reaktive Verdachtsfälle mit IFN- $\gamma$ -abhängiger IP-10 Expression auf, für die keine ICS-Daten vorlagen. Patient Q findet sich ebenfalls in den ELISA-Daten mit relevanten IP-10 und IFN- $\gamma$ -Werten wieder (Abb. 3.23d; mit Pfeil markiert).

### 3.3 Ergebnisse im Überblick

Tabelle 3.2 zeigt eine selektive Übersicht der Testergebnisse für die einzelnen Studienpatienten. Versuche, bei denen es nur zu unzureichender Induktion von Zytokinreaktionen (IFN- $\gamma$  aus PBMC-Überständen im ELISA) bzw. Versuche mit deutlichen unspezifischen Zytokinantworten in der „Non-NTM-LAP“-Gruppe (TNF- $\alpha$  und MIP-1 $\alpha$  im Vollblut und PBMC-Überständen im ELISA), wurden in der Tabelle nicht berücksichtigt. Die Übersicht (Tab. 3.2) zeigt, dass für alle Patienten der „NTM-LAP“-Gruppe in den jeweils durchgeführten Versuchen, positive Ergebnisse (grün) i.S. von deutlich messbaren Zytokinreaktionen nach Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen zu beobachten waren. In fast allen Fällen zeigten sich die Anteile an IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ko-exprimierenden T-Zellen bzw. die gemessenen Zytokin-Konzentrationen nach Stimulation mit PPD Sensitin höher ( $\blacktriangle$ ), als auf PPD Tuberculin. Für den Großteil der Patienten in der „Non-NTM-LAP“-Gruppe zeigten sich erwartungsgemäß negative Ergebnisse (rot;  $\times$ ) mit Zytokinreaktionen unterhalb der definierten Grenzwerte (Tab. 3.2). In der Gruppe der Verdachtsfälle zeigte sich ein heterogeneres Bild mit Patienten ohne jegliche Zytokinreaktion (Patienten S und V), aber auch Patienten mit deutlich messbaren Zytokinreaktionen in nahezu allen Versuchen (Patienten N, R, T und U) analog zur der „NTM-LAP“-Gruppe (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2 – Selektive Übersicht der Testergebnisse für die einzelnen Studienpatienten

	Patient	FACS D1	FACS D7	CBA IFN-γ (VB)	CBA TNF-α (VB)	CBA IP-10 (VB)	CBA IFN-γ (PBMC)	ELISA IFN-γ (VB)	ELISA IP-10 (VB)
NTM-LAP	A	▲	▲	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖	⊖
	B	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲
	C	▲	▲	▲	▲	▲	▲	∞	∞
	D	▲	▲	▲	▲	▼	▲	▲	▼
Non-NTM-LAP	E	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖
	F	✖	✖	✖	▲	✖	✖	✖	✖
	G	✖	✖	✖	✖	✖	⊖	✖	✖
	H	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	▲
	I	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖
	J	✖	✖	✖	▲	✖	✖	✖	✖
	K	✖	▲	▲	▲	✖	▼	▲	▼
	L	✖	✖	✖	✖	✖	▲	▲	▼
Verdachtsfälle	M	✖	✖	⊖	⊖	⊖	✖	⊖	⊖
	N	✖	▲	▲	▲	▼	▲	▲	✖
	O	⊖	⊖	▲	✖	▲	✖	✖	▲
	P	⊖	⊖	✖	▲	✖	✖	✖	✖
	Q	✖	⊖	▲	✖	▼	✖	▼	▼
	R	⊖	▲	▲	▲	▲	▼	▲	▼
	S	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖
	T	✖	▲	▲	▲	▲	▲	✖	✖
	U	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲	▲
	V	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖	✖
Y	∞	✖	✖	✖	✖	✖	▲	✖	

<b>NTM-LAP:</b>	Lymphadenopathie durch nachweislich Nicht-Tuberkulöse Mykobakterien	<b>IFN-γ:</b>	Interferon γ
<b>Non-NTM-LAP:</b>	Lymphadenopathie durch nachweislich nicht-mycobakterielle Ursache	<b>TNF-α:</b>	Tumor Nekrose Faktor α
<b>Verdachtsfälle:</b>	Lymphadenopatien unklarer Ursache	<b>IP-10:</b>	<i>Interferon-induced protein 10</i>
<b>FACS D1:</b>	Durchflusszytometrische Untersuchung nach Kurzzeit-Stimulation	<b>MIP-1α:</b>	<i>Macrophage inflammatory protein 1α</i>
<b>FACS D7:</b>	Durchflusszytometrische Untersuchung nach 2-Hit Langzeit-Stimulation	<b>VB:</b>	Vollblutproben
<b>CBA:</b>	Cytometric Bead Array®	<b>PBMC:</b>	Zellkulturüberstände von isolierten peripheren mononukleären Zellen
<b>ELISA:</b>	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay		

▲	Positiv (Sensitin/Tuberculin-Ratio > 1)	Positiv (FACS):	≥ 0,03% IFN-γ/TNFα ko-exprimierende T-Zellen	
∞	Positiv (Sensitin/Tuberculin-Ratio = 1)	Positiv (CBA):	Vollblut (pg/ml)	PBMC (pg/ml)
▼	Positiv (Sensitin/Tuberculin-Ratio < 1)		IFNγ > 31,68	IFNγ > 15,84
✖	Negativ		IP-10 (MFI)	TNFα > 35,04
⊖	Keine Daten/Proben vorhanden	Positiv (ELISA):	IFNγ > 80	
			IP-10 > 1	

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Durchflusszytometrie zur Detektion von mycobakteriellen Infektionen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer LAP durch eine gesicherte NTM-Infektion nach einer Kurzzeitstimulation mit PPD Sensitin Zytokinantworten in Form von IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  ko-exprimierenden T-Zellen im Durchflusszytometer zeigen und diese tendenziell stärker ausfallen, als nach Stimulation mit PPD Tuberculin. Ob die stärkeren Zytokinantworten allerdings tatsächlich spezifisch auf PPD Sensitin erfolgten und sich damit NTM als Erreger der LAP zuordnen lassen, lässt sich aufgrund der geringen Fallzahlen und dem damit fehlenden signifikanten Unterschied zu den Reaktionen auf PPD Tuberculin, nicht abschließend klären. Erst die zusammengefasste Analyse der „NTM-LAP“-Gruppe und der Gruppe der Verdachtsfälle zeigten sich signifikant stärkere Zytokinantworten auf PPD Sensitin, als nach Stimulation mit PPD Tuberculin (Abb. 3.7). Die bereits in Kapitel 1.4.1.1 & 1.4.1.2 beschriebene Kreuzreaktivität der beiden Antigene spielt hier wahrscheinlich ebenfalls eine tragende Rolle. Allerdings hat die Bildung des Sensitin/Tuberculin-Verhältnisses, in Anlehnung an die Studie von Magdorf *et al.*<sup>158</sup>, hier das Potential diesen Verdacht durchaus zu unterstützen. Steindor *et al.*<sup>159</sup> konnten in ihrer Arbeit ebenfalls bereits zeigen, dass der differentielle Einsatz von mycobakteriellen PPDs die durchfluss-zytometrische Detektion von mycobakteriellen Erregern möglich macht. Die T-Zellreaktionen der Gruppe der „Verdachtsfälle“ in der Kurzzeitstimulation suggerieren eine eventuelle mycobakterielle Ursache der LAP bei zwei Patienten (Patient U + Y), wobei durch die Indifferenz in den Reaktionsstärken auf die beiden mycobakteriellen Antigene, die Frage nach der Spezifität und damit dem Erreger offen bleibt. Um diese These weiter zu überprüfen, wurden die Zellen der Patienten weiterhin in Langzeit-Restimulations-Ansätzen (Kapitel 3.1.2) untersucht.

Die Langzeit-Stimulation war analog zu der Kurzzeit-Stimulation in der Lage mycobakterielle von nicht-mycobakteriellen Ursachen einer LAP in der Kohorte der bestätigten NTM-Fälle, anhand der Zytokinantworten zu unterscheiden. Es zeigt sich jedoch auffällig, dass die Steigerung der Zytokinantworten auf die Stimulation mit PPD Tuberculin deutlich stärker ausfiel, als im Vergleich zu PPD Sensitin (Abb. 3.4a + 3.5). Die Bildung des Sensitin/Tuberculin-Verhältnisses unterstützt hier zwar weiterhin

hinweisend die Diagnostik bzgl. des Erregers, jedoch liegen diese deutlich geringer oberhalb der Indifferenzlinie von 1, als noch in der Kurzzeit-Stimulation. Die bereits beobachtete Kreuzreaktivität der Antigene kommt in dieser Methode stärker zum Ausdruck führt so zu einer Abnahme der Spezifität zu Gunsten der erhofften Sensitivitätszunahme. Ebenfalls möglich ist hier eine Zunahme von unspezifischen Reaktionen auf die Restimulation, welche in ähnlicher Form bereits für die dualen Hauttests beim Einsatz von unterschiedlichen Konzentrationen der Stimulantien beschrieben wurden<sup>145</sup>. Auch Schuck et al. beschrieben unspezifische Expressionen von IFN- $\gamma$  in Zellkulturüberständen i.R. ihrer Restimulations-Versuche, welche letztlich ätiologisch nicht abschließend geklärt werden konnten<sup>184</sup>.

Die positiven Reaktionen in der „Non-NTM-Gruppe“ (Abb. 3.4b). könnte ein Hinweis auf mycobakterielle Ko-Infektionen, trotz bestätigter nicht-mycobakterieller Ursache der LAP darstellen oder aber ggf. auf eine bereits abgelaufene mycobakterielle Infektion oder sonstigen vorherigen Kontakt mit mycobakteriellen Antigenen hindeuten<sup>68</sup>. Es könnte sich jedoch auch um eine unspezifische Stimulation handeln. In jedem Fall wirft dieser Befund weitere Fragen bezüglich der Spezifität der Methode auf.

Für die Gruppe der „Verdachtsfälle“ zeigten die Patienten N, R, T und U ein sehr ähnliches Zytokinprofil (Tab 3.2), wie bei den bestätigten Fällen aus der „NTM-LAP“-Gruppe, womit durchaus angenommen werden könnte, dass NTM die Ursache für die LAP in diesen 4 Patienten sind. Die Ergebnisse suggerieren zunächst, dass durch eine Verstärkung der Zytokinantworten im Restimulations-Assay unterschwellige T-Zellreaktionen aus der Kurzzeit-Stimulation, im Sinne einer Sensitivitätssteigerung über das Detektionslimit gehoben und als potentielle NTM-Fälle identifiziert werden könnten. Patienten, die bereits in der Kurzzeit-Stimulation eine T-Zellreaktion gezeigt hatten, könnten darüber hinaus so z.T. noch bestätigt werden. Dies wäre v.a. für unklare Fälle in der Kurzzeit-Stimulation wertvoll. Für Patient R lagen keine Daten zur Kurzzeit-Stimulation vor, so dass nicht abschließend geklärt werden konnte, ob es sich um eine Identifizierung durch den Restimulations-Assay, eine Bestätigung des Vorergebnisses oder unspezifische Stimulation handelt. Letztlich war eine ätiologische „Entblindung“ für keinen der Patienten aus der Gruppe der „Verdachtsfälle“ möglich, da eine systematische Nachverfolgung der meist ambulanten Patienten nur schwerlich umzusetzen und daher für diese Arbeit nicht vorgesehen war.

Verglich man die Positivkontrollen der Kurzzeit- und Langzeitstimulationen musste festgestellt werden, dass die Verstärkung der Zytokinantworten nicht bei allen Patienten

zuverlässig zu sehen war und bei einzelnen Patienten die Reaktionen nach Langzeitstimulation sogar schwächer ausfielen, als zuvor nach Kurzzeit-Stimulation beobachtet (Abb. 3.6). Die oben formulierte These, über die Sensitivitätssteigerung ist mit dieser Datenlage somit nicht abschließend machbar, da es v.a. für die Gruppe der „Verdachtsfälle“ nicht auszuschließen ist, dass eventuelle, subdominante Zytokinantworten nicht von der Verstärkung erfasst wurden, wie es für einige Patienten in der Positivkontrolle der Fall war. Da Schuck *et al.*<sup>184</sup> jedoch bereits demonstrieren konnten, dass die Methode funktioniert bzw. alle Patienten aus der „NTM-LAP“-Gruppe eine deutliche Verstärkung ihrer Zytokinreaktion zeigten, sind die Fehlerquellen gegebenenfalls in den CD3/28-Dynabeads® als suboptimaler, unspezifischer Stimulus oder aber in den Kulturbedingungen zu suchen.

Zur weiteren Optimierung der Methodik kämen die Analyse von multifunktionalen T-Zellen mit der Messung von mehr Zytokinen als IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in Frage. Diverse Arbeiten konnten zeigen, dass i.R. einer T<sub>H</sub>1-Zellantwort gegen mycobakterielle Erreger Expressionsprofile von IL-2, CD154 (CD40-Ligand) und GM-CSF, Aussagen über die Effektivität der Immunreaktion, sowie Stadium der Infektion möglich machen<sup>104-106,159,187,188</sup>. Des Weiteren ließe sich die Methodik durch den Einsatz von spezies-spezifischen Antigenen, wie beispielsweise dem ESAT-6 oder CFP-10 für *M. tuberculosis*<sup>152</sup>, statt dem Einsatz von PPD Sensitin, als unspezifisches MAC-Proteingemisch, deutlich verfeinern und Kreuzreaktivitäten zu *M. tuberculosis* und anderen NTM-Spezies vermeiden. Lein *et al.* konnten in ihrer Arbeit reziprok dazu zeigen, dass auf die Stimulation mit ESAT-6 nur PBMCs aus Patienten mit einer pulmonalen Tuberkulose, aber weder Patienten mit einer pulmonalen MAC-Infektion noch gesunde Kontrollen, mit einer verstärkten IFN- $\gamma$ -Sekretion reagierten<sup>189</sup>. Wie bereits in Kapitel 1.2.2.1 beschrieben, ist MAC zwar das häufigste Isolat bei NTM-Infektionen in Europa und den USA<sup>69,75,77</sup>, jedoch stellt sich beispielsweise für Patient B mit einer nachgewiesenen *M. malmoense*-Infektion die Frage, ob ein spezies-spezifisches Antigen ggf. stärkere Zytokinreaktionen ausgelöst hätte. Die Arbeit von Steindor *et al.* konnte bereits zeigen, dass die T-Zellreaktionen von Mukoviszidose-Patientin mit *M. abscessus*-Infektion auf PPD Abscessin deutlicher ausfielen, als auf PPD Tuberculin und Sensitin, was suggeriert, dass solche spezies-spezifischen Antigene als Bestandteil der bereits eingesetzten PPDs existieren<sup>159</sup>. Letztlich werden die komplette Genom-Sequenzierung, sowie vergleichende Proteomik-Analysen der je nach Region epidemiologisch relevantesten NTM-Spezies nötig sein, um spezifischere Antigene bzw. Epitope zu identifizieren, wie es

bereits für *M. tuberculosis* durchgeführt wurde<sup>184,190,191</sup>. Die Identifizierung von spezifischen Antigenen für die jeweilige NTM-Spezies sollte ebenfalls eine Optimierung der Suche nach weiteren Biomarkern für NTM-Infektionen nach sich ziehen.

## **4.2 Zytokinanalysen im stimulierten Vollblut und PBMC-Überständen**

### **4.2.1 Zytokinprofile der „NTM-LAP“-Gruppe**

Die Daten aus Kapitel 3.2.2-3 demonstrierten, dass sich IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , sowohl in Vollblutproben, als auch in PBMC-Überständen nach Stimulation mit mycobakteriellen Antigenen zuverlässig induzieren und im CBA, sowie ELISA messen lassen. Analog zu den ICS-Versuchen zeigten sich für die Patienten der „NTM-LAP“-Gruppe ausschließlich sensitin-dominante Zytokinantworten mit Sensitin/Tuberculin-Verhältnissen  $>1$ . Das Expressionsmuster für MIP-1 $\alpha$  im Vollblut zeigte sich im ELISA ebenfalls mit deutlich höheren Konzentrationen auf die Stimulation mit PPD Sensitin (Abb. 3.12a) und erhärtet damit zunächst die Hypothese, dass MIP-1 $\alpha$  sich als neues Marker-Zytokin in der Diagnostik von mycobakteriellen LAP etablieren könnte. Die Messungen für IP-10 fielen auffällig niedrig aus, so dass sich die Frage stellt, ob es ein generelles Problem mit der Induzierbarkeit von IP-10 unter den beschriebenen Kulturbedingungen geben könnte, was bei lückenhaften Positivkontrollen nicht ausgeschlossen werden kann. Die vorliegenden Daten zeigten mit den relativ schwachen Reaktionen in der „NTM-LAP“-Gruppe, vorerst ernüchternde Ergebnisse für IP-10 als Zytokinkandidat. Limitierend zeigte sich hier jedoch auch wieder die geringe Patientenzahl der Kohorte für aussagekräftigere Ergebnisse.

### **4.2.2 Zytokinprofile der „Verdachtsfälle“ & „Non-NTM-LAP“-Gruppe**

Im CBA zeigten sich für die Gruppe der „Verdachtsfälle“ die Patienten N, R, T und U mit zuverlässigen IFN- $\gamma$  und IP-10-Induktionen im stimulierten Vollblut, dessen Konzentrationen, sowie ihre Sensitin-/Tuberculin-Verhältnisse sich größtenteils mit dem Zytokinprofil der „NTM-LAP“-Gruppe deckten und somit den Verdacht zulassen, dass sich die LAP in diesen Patienten auf eine mycobakterielle Genese zurückführen lässt. Im ELISA zeigten sich für die Patienten N, R und U sehr ähnliche Zytokinprofile für IFN- $\gamma$  und IP-10 im Vollblut. Die niedrigen Konzentrationen für Patient T sind für IFN- $\gamma$  a.e. auf einen Messfehler im ELISA, für IP-10, bei bereits sehr niedrigen IP-10-Konzentrationen im CBA,

ggf. auf einen Kulturfehler zurückzuführen. Interessanterweise zeigen die Patienten O und Q ebenfalls ausgeprägte Konzentrationen an IFN- $\gamma$  und IP-10, welche jedoch nicht immer sensitin-dominant ausfallen und nur in Vollblut-Stimulationen zu beobachten sind. Patient O hatte in den durchfluss-zytometrischen Analysen keine Zytokinreaktion gezeigt und im Falle von Patient Q lagen keine Daten aus den ICS-Versuchen vor. Anhand der vorliegenden Daten erscheint sowohl für die Patienten N, R, T und U, als auch für die Patienten O und Q eine mycobakterielle Infektion als Ursache der Zytokininduktion möglich; lässt sich jedoch nicht weiter erhärten.

Die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen für die Gruppe der „Verdachtsfälle“ zeigten sich in den CBA-Vollblutanalysen analog zu IFN- $\gamma$  und den ICS-Versuchen mit einem sensitin-dominanten Expressionsmuster. Allerdings zeigten sich in den Vollblutanalysen ebenfalls bereits relevante TNF- $\alpha$ -Konzentrationen für drei Patienten (Patient F, J, K) der „Non-NTM-LAP“-Gruppe. Interessanterweise zeigte Patient K ebenfalls eine geringe, aber beständigen Expression von IFN- $\gamma$  und IP-10 im Vollblut, so dass sich die Frage nach unspezifische Induktion oder einer zusätzlichen oder abgelaufenen bzw. latenten mycobakteriellen Infektion neben der nicht-mycobakteriellen Ursache der LAP, stellt. Eine solche Ko-Infektion hätte Kreuzreaktionen mit dem eingesetzten PPDs zur Folge<sup>145</sup>. Eine aktive oder abgelaufene tuberkulöse Infektion der Patienten war im Vorfeld bereits durch den T-SPOT®TB-Assay (Kap. 2.2.2.11) ausgeschlossen worden. Von Reyn et al. hatten 2001 bereits festgestellt, dass in einer gesunden Kohorte von 784 Angestellten und Medizinstudenten im US-Gesundheitswesen mehr als 50% aller Tuberkulin-Hauttests aufgrund von NTM als falsch positiv ausfallen und diese a.e. auf abgelaufene, asymptomatische Infektionen mit MAC und anderen Umwelt-NTM zurückzuführen sind<sup>144</sup>. Weitere epidemiologische Daten zu asymptomatischen NTM-Infektionen in der Bevölkerung liegen zurzeit nicht vor. Es verbleibt dann jedoch weiterhin die Frage, weshalb diese Patienten nicht bereits in den ICS-Versuchen reagiert hatten.

In den Auswertungen für TNF- $\alpha$  in den PBMC-Überständen im CBA, sowie ELISA zeigte sich jedoch eine eindeutige, unspezifische Expression von TNF- $\alpha$  in allen Patientenproben in der „Non-NTM-LAP“-Gruppe, sowie auch für die Gruppe der Verdachtsfälle, so dass sich TNF- $\alpha$  in dieser Hinsicht als individuelles Markerzytokin disqualifiziert. Für MIP-1 $\alpha$  zeigten sich ebenfalls, sowohl im Vollblut als auch in den PBMC-Überständen eine deutlich unspezifische Expression für die „Non-NTM-LAP“-Gruppe, sowie in der Gruppe der „Verdachtsfälle“. Dies dämpft die initial vielversprechenden Resultate in der „NTM-LAP“-Gruppe und schmälert die Rolle von MIP-1 $\alpha$  als neuen Zytokinkandidaten deutlich.

### 4.3 IP-10 als neuer Zytokinkandidat für die Detektion von NTM

Diese Arbeit konnte zeigen, dass neben IFN- $\gamma$ , als bereits etablierter Goldstandard in der immunologischen Detektion von mycobakteriellen Erregern, IP-10 im PPD Sensitiv-stimulierten Vollblut von bestätigten NTM-Patienten ebenfalls in deutlich messbaren Konzentrationen auftritt. Des Weiteren konnten in den stimulierten Vollblutproben der Patienten N, R, T und U aus der Gruppe der „Verdachtsfälle“ ebenfalls deutliche IP-10-Konzentrationen gemessen werden, während sich in der „Non-NTM-LAP“-Gruppe, im Gegensatz zu TNF- $\alpha$  und MIP-1 $\alpha$ , kaum unspezifische Induktion zeigte. Die Zytokinprofile für IP-10 zeigten sich nicht immer für jeden Patienten sensitiv-dominant, was ggf. auf die bereits in Kapitel 4.1 diskutierte Kreuzreaktivität der eingesetzten PPDs zurück geführt werden könnte. Die Studien von Alsleben *et al.* und Latorre *et al.* konnten zeigen, dass der Einsatz der tuberkulose-spezifischen Antigenen ESAT-6, CFP-10 und TB7.7 zu einer spezifischen IP-10-Expression in pädiatrischen Patienten mit aktiver und latenter Tuberkulose führt<sup>121,192</sup>. Patienten mit einer NTM-Infektion zeigten in den Arbeiten hingegen keine erhöhten IP-10-Konzentrationen<sup>121,192</sup>. Es ist daher denkbar, dass auch der Einsatz von spezie-spezifischen Antigenen für NTM zu einer deutlichen Verbesserung der Spezifität der Methode führt. Mehrere Arbeiten konnten demonstrieren, dass der kombinierte Einsatz von IFN- $\gamma$  und IP-10 in *in vitro*-Tests, im Vergleich zu den kommerziell verfügbaren IGRAs, zu einer erhöhten Sensitivität in der Detektion von Tuberkulose-Patienten führt, ohne die Spezifität herab zu setzen<sup>193-195</sup>. Diese Sensitivitätssteigerung könnte sich v.a. in pädiatrischen Populationen mit bislang reduzierten Detektionsraten im IGRA in immunsupprimierten oder jungen Kindern < 5 Jahren, als nützlich erweisen<sup>121,192,196,197</sup>.

Eine Arbeit von Hong *et al.* konnte in einer kleinen Kohorte von erwachsenen Patienten mit pulmonaler Tuberkulose zeigen, dass die serielle Messung der Serumkonzentrationen von IP-10, im Gegensatz zu IGRAs, zur Überwachung, sowie Erfolgskontrolle der antituberkulösen Therapie beitragen könnte<sup>198</sup>. Da es sich bei der primär empfohlenen Therapie der Lymphadenitis durch NTM um die chirurgische Exzision handelt<sup>69,175,176</sup>, ist diese Eigenschaft von IP-10 wahrscheinlich interessanter für Patienten mit pulmonaler NTM-Infektion, bei der primär eine medikamentöse Therapie mit mehreren Antibiotikaklassen im Vordergrund steht<sup>69,199,200</sup>.

In den Korrelationsanalysen in Kapitel 3.2.5 zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen den gemessenen Konzentrationen von IFN- $\gamma$  und IP-10, sowohl für die bestätigten Fälle der „NTM-LAP“-Gruppe, als auch für die Patienten N, R, T und U aus der

Gruppe der „Verdachtsfälle“ (s. Abb. 3.23c+d). Eine Steigerung der Sensitivität für die Detektion von NTM ist hier ebenfalls denkbar, konnte aber aufgrund der geringen Fallzahl in der „NTM-LAP“-Gruppe in dieser Arbeit nicht untersucht werden. Für IP-10 werden in den o.g. Studien<sup>121,193</sup> des weiteren sehr viel höhere Konzentrationen als für IFN- $\gamma$  nach spezifischer Stimulation, sowie eine alters-unabhängige Expression in Kindern beschrieben<sup>201</sup>. Auffällig sind daher die niedrigen Konzentrationen von IP-10, welche in dieser Arbeit im ELISA gemessen wurden. Für den CBA konnte, aufgrund der fehlerhaften Standardkurve keine Konversion in IP-10 Konzentrationen vorgenommen werden, so dass ein Vergleich hier nicht möglich war. Es verbleibt die Frage, ob die Ursache der niedrigen IP-10 Konzentrationen bei Stimulation, Kulturbedingungen oder Messbedingungen zu suchen ist. Da sowohl die Stimulations-, als auch die Kulturbedingungen für alle Proben identisch waren, ist ggf. die Anwendung von verschiedenen ELISA-Kits die Fehlerquelle.

#### **4.4 Limitationen**

Die Aussagekraft der Arbeit ist aufgrund einiger methodischer Limitationen eingeschränkt. Aufgrund der niedrigen Inzidenz an NTM-Infektionen in Deutschland stellt die geringe Anzahl der Studienpatienten, sowie die inhomogene Verteilung der rekrutierten Patienten auf die drei Gruppen ein offensichtliches Problem für die statistische Vergleichbarkeit der Daten dar. Das Studiendesign hatte ursprünglich eine vierte Gruppe mit bestätigter tuberkulöser LAP vorgesehen, welche jedoch ebenfalls aufgrund der sehr geringen Inzidenz an pädiatrischer Tuberkulose in Deutschland, nicht in ausreichender Anzahl akquiriert werden konnte. Eine solche Gruppe hätte sicherlich weitere wertvolle Informationen bzgl. der Zytokinmuster in bestätigten mycobakteriellen Infektionen, sowie hinsichtlich der Kreuzreaktivität zwischen den mycobakteriellen Antigenen ergeben und somit zur weiteren Validierung der eingesetzten Methoden beigetragen. Eine klinische Nachverfolgung der Patienten aus der Gruppe der „Verdachtsfälle“ hätte eine „Entblindung“ und so ggf. eine definitive ätiologische Einordnung der gemessenen Zytokinmuster ermöglicht. Auf die Limitationen des eingesetzten PPD Sensitin als vergleichsweise unspezifisches Antigen wurde bereits in Kapitel 4.1 eingegangen. Ebenfalls limitierend erscheint der Auswahlprozess der Zytokinkandidaten für die Experimente mit den Vollblut- und PBMC-Überständen. Der Vor-Versuch wurde nur mit Vollblutproben von einem Patienten der „NTM-LAP“-Gruppe,

sowie von vier Patienten aus der Gruppe der Verdachtsfälle, die in den ICS-Versuchen durchflusszytometrisch bereits starke Zytokinantworten auf die Stimulation mit PPD Sensitin gezeigt hatten, durchgeführt (s. Kapitel 3.2.1). Dementsprechend sind die Ergebnisse für die Verdachtsfälle mit einem gewissen *Bias* belegt, welcher durch den Einsatz von lediglich Proben von bestätigten NTM-Patienten im besagten Vor-Versuch, hätte verhindert werden können. Letztlich bestätigen sich die Zytokinprofile der Patienten N, R, T & U, sowohl im CBA, als auch im ELISA zum größten Teil mit denen der bestätigten Patienten B, C & D. Dennoch bleibt die Frage nach durch diese Methodik „verpassten“ Zytokinkandidaten, offen.

#### **4.5 Schlussfolgerung**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der durchfluss-zytometrische Nachweis von multifunktionalen T-Zellen nach Stimulation mit mycobakteriellen PPD die Identifizierung von NTM als Ursache einer LAP in pädiatrischen Patienten möglich macht. Die Langzeit-Restimulation führt zu einer Sensitivitätssteigerung i.S. einer deutlich gesteigerten Zytokinantwort, welche allerdings auf Kosten der Spezifität gewonnen wird. Von den analysierten Zytokinen im stimulierten Vollblut zeigte sich lediglich IFN- $\gamma$  im CBA in der Lage, analog zur Durchflusszytometrie, NTM als wahrscheinliche Ursache einer LAP zu identifizieren. IP-10 im stimulierten Vollblut zeigte ebenfalls zwar ähnliches Potential, reichte in dieser Arbeit jedoch nicht für eine statistische Signifikanz.

Die Entwicklung von spezies-spezifischen Antigenen für die häufigsten Vertreter von NTM, wie bereits für die Tuberkulose-Diagnostik verfügbar, sowie der kombinierte Einsatz von IP-10 und IFN- $\gamma$  würden diagnostische Immun-Tests und damit die spezifische Detektion von NTM in Zukunft deutlich verbessern.

## 5

## Literaturverzeichnis

1. Park YW. Evaluation of neck masses in children. *Am Fam Physician*. 1995;51(8):1904-1912. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/7762481>.
2. Nield LS, Kamat D. Lymphadenopathy in children: When and How to Evaluate. *Clin Pediatr (Phila)*. 2004;43(1):25-33. doi:10.1177/000992280404300104.
3. Nelson WE, Behrman RE, Kliegman RM AA. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Philadelphia: WB Saunders; 1996.
4. Leung, A. K., Robson WL. Cervical lymphadenopathy in children. *Can J Pediatr*. 1991;3:10-17.
5. Larsson LO, Bentzon MW, Kelly KB, et al. Palpable lymph nodes of the neck in Swedish schoolchildren. *Acta Pædiatrica*. 1994;83(10):1091-1094. doi:10.1111/j.1651-2227.1994.tb12992.x.
6. Bamji M, Stone RK, Kaul A, Usmani G, Schachter F, Wasserman E. Palpable Lymph and Infants Nodes in Healthy Newborns. *Pediatrics*. 1986;78(4):573-575.
7. Herzog LW. Prevalence of Lymphadenopathy of the Head and Neck in Infants and Children ° T ' than in children with febrile illness . *Clin Pediatr (Phila)*. 1983;22(7):485-487. doi:10.1177/000992288302200703.
8. Peters T, Edwards K. Cervical lymphadenopathy and adenitis. *Pediatr Rev*. 2000;Dec;21(12):399-405.
9. Niedzielska G, Kotowski M, Niedzielski A, Dybiec E, Wiczorek P. Cervical lymphadenopathy in children- Incidence and diagnostic management. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2007;71(1):51-56. doi:10.1016/j.ijporl.2006.08.024.
10. Soldes O, Younger G, Hirsch B. Predictors of Malignancy in Childhood Peripheral Lymphadenopathy. *J Pediatr Surg*. 1999;34(10):1447-1452.
11. Dajani AS, Garcia RE, Wolinsky E. Etiology of Cervical Lymphadenitis in Children. *N Engl J Med*. 1963;268(24):1329-1333. doi:10.1056/NEJM196306132682403.
12. Barton LL, Feigin RD, Louis S. Childhood cervical lymphadenitis : A reappraisal. *J Pediatr*. 1974;84(6):846-852.
13. Lane RJ, Keane WM, Potsic WP. Pediatric infectious cervical lymphadenitis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1980;88(4):332—335. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/6821410>.
14. AM L, FA O. Peripheral lymphadenopathy in childhood: Ten-year experience with excisional biopsy. *Am J Dis Child*. 1978;132(4):357-359. doi:10.1001/archpedi.1978.02120290029003.
15. Connolly AAP, Mackenzie K. Paediatric neck masses - a diagnostic dilemma. *J Laryngol Otol*. 1997;111:541-545.
16. Malley R. *Lymphadenopathy*. (Henretig et al., ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
17. Leung AKC, Davies HD. Cervical lymphadenitis: Etiology, diagnosis, and management. *Curr Infect Dis Rep*. 2009;11(3):183-189. doi:10.1007/s11908-009-0028-0.
18. Minamoto GY, Rosenberg AS. FUNGAL INFECTIONS IN PATIENTS WITH ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME. *Med Clin North Am*. 1997;81(2):381-409. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0025-7125\(05\)70523-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-7125(05)70523-X).
19. Leggiadro R, Kline M, Hughes W. Extrapulmonary cryptococcosis in children with acquired immunodeficiency syndrome. *Pediatr Infect Dis J*. 1991;10(9):658-662.
20. Groll AH, Walsh TJ, Mu MC. Current approaches to diagnosis and treatment of fungal infections in children infected with human immuno deficiency virus. *Eur J Pediatr*. 1999;158:187-199.
21. McCabe RE, Brooks RG, Dorfman RF, Remington JS. Clinical Spectrum in 107 Cases of Toxoplasmic Lymphadenopathy. 1987;9(4):12-14.
22. Rajasekaran K, Krakovitz P. Enlarged neck lymph nodes in children. *Pediatr Clin North Am*. 2013;60(4):923-936. doi:10.1016/j.pcl.2013.04.005.
23. Leung AKC, Robson WLM. Childhood cervical lymphadenopathy. *J Pediatr Health Care*. 2004;18(1):3-7. doi:10.1016/j.pedhc.2003.08.008.
24. Chatterjee D. The mycobacterial cell wall : structure , biosynthesis and sites of drug action.
25. Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;123(1):11-18. doi:<http://dx.doi.org/>.
26. Brennan P, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:29-63. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000333.
27. Koch R. Die Aetiologie der Tuberculose. *Berliner Klin Wochenschrift*. 1882;19(15):221-230.
28. Tsukamura M, Mizuno S, Toyama H. Taxonomic Studies on the Mycobacterium tuberculosis Serie s Shoji MIZUNO , and Haruo TOYAMA The National Chubu Hospital , Aichi ( Accepted for publication ,. 1985;29(4):285-299.
29. Soolingen DVAN, Hoogenboezem THE, Haas PEWDE, et al. A Novel Pathogenic Taxon of the Mycobacterium tuberculosis Complex , Canetti : Characterization of an Exceptional Isolate from Africa. 2016:1236-1245.
30. World Health Organization (WHO), The Global TB Programme. *WHO Global Tuberculosis Resport 2015*; 2015. Available at: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/).
31. Robert Koch-Institut. *Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2014*; 2014. Available at: [http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/T/Tuberkulose/Download/TB2014.pdf?\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/T/Tuberkulose/Download/TB2014.pdf?_blob=publicationFile).
32. Robert Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin*; 2017. doi:10.17886/EpiBull-2015-014.
33. Fiebig L, Hauer B, Brodhun B, Altmann D, Haas W. Tuberculosis in Germany: a declining trend coming to an end? *Eur Respir J*. 2015. doi:10.1183/13993003.01410-2015.
34. Marx FM, Fiebig L, Hauer B, et al. Higher Rate of Tuberculosis in Second Generation Migrants Compared to Native Residents in a Metropolitan Setting in Western Europe. *PLoS One*. 2015;10(6):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0119693.
35. Turner RD, Bothamley GH. Cough and the Transmission of Tuberculosis. 2014:1-6. doi:10.1093/infdis/jiu625.
36. Riley R, Mills C, Nyka W, et al. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. *Am J Hyg*. 1959;70:185-196.

37. Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*. 2011;469(7331):483-490. doi:10.1038/nature09657.
38. Ayakaka I, Kim S, Menyha H, et al. Variability of Infectious Aerosols Produced during Coughing by Patients with Pulmonary Tuberculosis Characteristics of Patients with TB. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(5):450-457. doi:10.1164/rccm.201203-0444OC.
39. Loudon RG, Roberts RM. Droplet Expulsion from the Respiratory TRACT. *Am Rev Respir Dis*. 1967;95(3):435-442. doi:10.1164/arrd.1967.95.3.435.
40. Sultan L, Nyka W, Mills C, O'Grady F, Wells W, Riley RL. Tuberculosis Disseminators. *Am Rev Respir Dis*. 1960;82(3):358-369. doi:10.1164/arrd.1960.82.3.358.
41. Robert Koch-Institut. *Epidemiologisches Bulletin*.; 2016. doi:10.17886/EpiBull-2016-014.
42. Sepkowitz KA. How Contagious Is Tuberculosis ? 1996:954-962.
43. Polesky A, Grove W, Bhatia G. Peripheral Tuberculous Lymphadenitis. *Medicine (Baltimore)*. 2005;84(6):350-362. doi:10.1097/01.md.0000189090.52626.7a.
44. Geldmacher H, Taube C, Kroeger C, Magnussen H, Kirsten D. Assessment of Lymph Node Tuberculosis in Northern Germany \*. *Chest*. 2002;121:1177-1182.
45. Marais BJ, Wright CA, Schaaf HS, et al. Tuberculous Lymphadenitis as a Cause of Persistent Cervical Lymphadenopathy in Children From a Tuberculosis-Endemic Area. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25(2).
46. Wallgren A. On contagiousness of childhood tuberculosis. *Acta Paediatr Scand*. 1937;22:229--234.
47. Correa AG. Unique aspects of tuberculosis in the pediatric population. *Clin Chest Med*. 1997;18(1):89-98.
48. Starke R, Taylor-watts KT. Tuberculosis in the Pediatric Population of Houston, Texas. *Pediatrics*. 1989;84(1):28-35.
49. Kipfer R, Schmid J. Beitrag zur Frage der Inkubationszeit und ihrer dissoziierten Phasen bei der Lungentuberkulose. *Tuberkulose*. 1952;9:65-75.
50. Menzies D. Pulmonary Perspective Interpretation of Repeated Tuberculin Tests. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159:15-21.
51. Vynnycky E, Fine PEM. Lifetime Risks , Incubation Period , and Serial Interval of Tuberculosis. *Am J Epidemiol*. 2000;152(3):247-263.
52. Bloom BR, Murray CJL. Tuberculosis: Commentary on a Reemergent Killer. *Science (80- )*. 1992;257(5073):1055-1064. doi:10.1126/science.257.5073.1055.
53. Arend SM, van Soolingen D, Ottenhoff THM, van Dissel JT. Repeatedly negative tuberculin skin tests followed by active tuberculosis in an immunocompetent individual. *Neth J Med*. 2001;58(2):76-81. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0300-2977(00)00100-5.
54. Doveren RF, Keizer ST, Kremer K, van Soolingen D. Connection between 2 tuberculosis outbreaks demonstrated after 8 years by DNA-fingerprinting of the causative mycobacteria. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1998;142(4):189-192. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/9557025>.
55. Lillebaek T, Dirksen A, Baess I, Strunge B, Thomsen VØ. Molecular Evidence of Endogenous Reactivation of Mycobacterium tuberculosis after 33 Years of Latent Infection. *J Infect Dis*. 2002;185:401-404.
56. Garra AO, Redford PS, Mcnab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MPR. *The Immune Response in Tuberculosis*.; 2013. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095939.
57. Gengenbacher M, Kaufmann SHE. Mycobacterium tuberculosis : success through dormancy. *Fed Eur Microbiol Soc Microbiol Rev*. 2012;36:514-532. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00331.x.
58. Vynnycky E, Fine PEM. Lifetime Risks , Incubation Period , and Serial Interval of Tuberculosis. *Am J Epidemiol*. 2000;152(3).
59. Reyn CFVON, Waddell RD, Eaton T, et al. Isolation of Mycobacterium avium Complex from Water in the United States, Finland , Zaire , and Kenya. 1993;31(12):3227-3230.
60. Falkinham J. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med*. 2002;23:529-551.
61. Tortoli E. Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy : the New Mycobacteria of the 1990s. 2003;16(2):319-354. doi:10.1128/CMR.16.2.319.
62. McNabb A, Eisler D, Adie K, et al. Assessment of Partial Sequencing of the 65-Kilodalton Heat Shock Protein Gene ( hsp65 ) for Routine Identification of Mycobacterium Species Isolated from Clinical Sources. 2004;42(7):3000-3011. doi:10.1128/JCM.42.7.3000.
63. Olivier KN, Weber DJ, Jr RJW, et al. I : Multicenter Prevalence Study in Cystic Fibrosis. 2003;167:828-834. doi:10.1164/rccm.200207-6780C.
64. Reyn CF Von, Arbeit RD, Horsburgh CR, et al. Sources of Disseminated Mycobacterium avium Infection in AIDS \*. *J Infect*. 2002;44:166-170. doi:10.1053/jinf.2001.0950.
65. Aitken M, Limaye A, Pottinger P, et al. Respiratory Outbreak of Mycobacterium abscessus Subspecies massiliense in a Lung Transplant and Cystic Fibrosis Center. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:231-232.
66. Bryant JM, Grogono DM, Greaves D, et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of Mycobacterium abscessus between patients with cystic fi brosis : a retrospective cohort study. *Lancet*. 381(9877):1551-1560. doi:10.1016/S0140-6736(13)60632-7.
67. Fairchok MP, Rouse JH, Morris SL. Age-Dependent Humoral Responses of Children to Mycobacterial Antigens. 1995;2(4):443-447.
68. C. von R, C. H, K. O. Skin test reactions to Mycobacterium tuberculosis purified protein derivative and Mycobacterium avium sensitin among health care workers and medical students in the United States. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001;5(12):1122-1128.
69. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott B a, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(4):367-416. doi:10.1164/rccm.200604-571ST.
70. Prince DS, Peterson DD, Steiner RM, et al. Infection with Mycobacterium avium Complex in Patients without

- Predisposing Conditions. *N Engl J Med*. 1989;321(13):863-868. doi:10.1056/NEJM198909283211304.
71. Cox JN, Brenner ER, Bryan CS. Changing Patterns of Mycobacterial Disease at a Teaching Community Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1994;15(8):513-515.
  72. Griffith DE, Girard WM, Wallace RJ. Clinical Features of Pulmonary Disease Caused by Rapidly Growing Mycobacteria An Analysis of 154 Patients. *Am Rev Respir Dis*. 2003;147:1271-1278.
  73. Huang JH, Kao PN, Adi V, Ruoss SJ. Mycobacterium avium-intracellulare Pulmonary Infection in HIV-Negative Patients Without Preexisting Lung Disease: Diagnostic and Management Limitations. *Chest*. 1999;115(4):1033-1040. doi:http://dx.doi.org/10.1378/chest.115.4.1033.
  74. Falkingham JO. The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. *Can J Infect Dis*. 2003;14(5):281-286.
  75. Brien RJO, Geiter LJ, Snider DE. The Epidemiology of Nontuberculous Mycobacterial Diseases in the United States. 1986:1007-1014.
  76. Wolinsky E. Nontuberculous Mycobacteria and Associated Diseases. *Am Rev Respir Dis*. 1979;119:107-159.
  77. Winthrop KL, Mcnelley E, Kendall B, et al. Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease Prevalence and Clinical Features An Emerging Public Health Disease. 2006;2006(4):2005-2006. doi:10.1164/rccm.201003-0503OC.
  78. Haverkamp MH, Arend SM, Lindeboom J a, Hartwig NG, van Dissel JT. Nontuberculous mycobacterial infection in children: a 2-year prospective surveillance study in the Netherlands. *Clin Infect Dis*. 2004;39(4):450-6. doi:10.1086/422319.
  79. Reuss AM, Wiese-Posselt M, Weissmann B, et al. Incidence rate of nontuberculous mycobacterial disease in immunocompetent children: a prospective nationwide surveillance study in Germany. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(7):642-4. doi:10.1097/INF.0b013e3181978e8e.
  80. Vu T-T-V, Daniel SJ, Quach C. Nontuberculous mycobacteria in children: a changing pattern. *J Otolaryngol*. 2005;34 Suppl 1:S40-4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16089239>.
  81. Sigalet BD, Fanning A, Control D. Atypical Tuberculosis in the Pediatric Patient: Implications for the Pediatric Surgeon. 1992:1381-1384.
  82. Wolinsky E. Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculous cases with long-term follow-up. *Clin Infect Dis*. 1995;20(4):954-63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7795100>.
  83. Colville A. Retrospective Review of Culture-Positive Mycobacterial Lymphadenitis Cases in Children in Nottingham , 1979-1990. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990;12(3):192-195.
  84. Henriques B, Hoffner SE, Petrini B, Juhlin I, Wahlen P, Kallenius G. Infection with Mycobacterium malmoense in Sweden : Report of 221 Cases. 1994:596-600.
  85. Lindeboom JA, Prins JM, Coppentraet ESB Van, Lindeboom R, Kuijper EJ. Cervicofacial Lymphadenitis in Children Caused by Mycobacterium haemophilum. 2005:1569-1575.
  86. Panesar J, Higgins K, Daya H, Forte V, Allen U. Nontuberculous mycobacterial cervical adenitis: a ten-year retrospective review. *Laryngoscope*. 2003;113(1):149-54. doi:10.1097/00005537-200301000-00028.
  87. Panagiotis Spyridis, Helen C. Malte. Mycobacterial Cervical Lymphadenitis in Children: Clinical and Laboratory Factors of Importance for Differential Diagnosis. *Scand J Infect Dis*. 2001;33(5):362-366. doi:10.1080/003655401750174002.
  88. Reiling N, Hölischer C, Fehrenbach A, et al. Cutting Edge: Toll-Like Receptor (TLR)2- and TLR4-Mediated Pathogen Recognition in Resistance to Airborne Infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*. 2002;169:3480-3484. doi:10.4049/jimmunol.169.7.3480.
  89. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(25):14459-14463.
  90. Fulton SA, Johnsen JM, Wolf SF, Sieburth DS, Al FET, Mmun INI. Interleukin-12 Production by Human Monocytes Infected with Mycobacterium tuberculosis : Role of Phagocytosis. *Infect Immun*. 1996;64(7):2523-2531.
  91. Bermudez LE, Wu M, Young LS. Interleukin-12-Stimulated Natural Killer Cells Can Activate Human Macrophages To Inhibit Growth of Mycobacterium avium. *Infect Immun*. 1995;63(10):4099-4104.
  92. Gately MK, Warriar RR, Honasoge S, et al. Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of IFN- $\gamma$  in vivo. *Int Immunol*. 1994;6(1):157-167.
  93. Chan BSH, Perussia B, Gupta JW, et al. Induction of Interferon  $\gamma$  Production by Natural Killer Cell Stimulatory Factor: Characterization of the Responder Cells and Synergy with Other Inducers. *J Exp Med*. 1991;173(April):869-879.
  94. Schrader JW, Wong HW, Clark-lewis IAN, Mckimm-breschkin JL, Harris AW, Schrader JW. Interferon-gamma induces enhanced expression of Ia and H-2 antigens on B lymphoid , macrophage , and myeloid cell lines . *J Immunol*. 1983;131:788-793.
  95. Cohn, ZANVIL A and Fedorko ME. The formation and fate of lysosomes. *Lysosomes Biol Pathol*. 1969;1:43.
  96. Silva MT, Appelberg RUI, Silva MNT, Macedo PM. In Vivo Killing and Degradation of Mycobacterium aurum within Mouse Peritoneal Macrophages. *Infect Immun*. 1987;55(9):2006-2016.
  97. Walker L, Lowrie D. Killing of Mycobacterium microti by immunologically activated macrophages. *Nature*. 1981;293:69-70.
  98. Gwinn MR, Vallyathan V. Respiratory Burst : Role in Signal Transduction in Alveolar Macrophages. *J Toxicol Enviromental Heal Part B*. 2006;9:27-39. doi:10.1080/15287390500196081.
  99. Wallis RS, Ellner JJ. Induction of interleukin 1 and tumor necrosis factor by mycobacterial proteins : The monocyte Western blot. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(May):3348-3352.
  100. Barnes PF, Chatterjee D, Abrams JS, et al. Cytokine production induced by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan . Relationship to chemical structure . *J Immunol*. 1992;149:541-547.
  101. Trinchieri G, Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. *J Leukoc Biol* . 1996;59(4):505-511. Available at:

- <http://www.jleukbio.org/content/59/4/505.abstract>.
102. D'Andrea A, Aste-amezaga M, Trinchieri G. Interleukin 10 ( IL-10 ) Inhibits Human Lymphocyte Interferon 3 , - Production by Suppressing Natural Killer Cell Stimulatory Factor / IL-12 Synthesis in Accessory Cells. *J Exp Med*. 1993;178(September):1041-48.
  103. D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G. Stimulatory and Inhibitory Effects of Interleukin ( IL ) -4 and IL13 on the Production of Cytokines by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells : Priming for IL12 and Tumor Necrosis Factor-alpha Production. *J Exp Med*. 1995;181(February):537-546.
  104. Darrah PA, Patel DT, Luca PM De, et al. Multifunctional T H 1 cells define a correlate of vaccine- mediated protection against Leishmania major. *Nat Med*. 2007;13(7):843-850. doi:10.1038/nm1592.
  105. Millington KA, Innes JA, Hackforth S, et al. Mycobacterium tuberculosis -Specific T Cells and Antigen Load 1. *J Immunol*. 2007;178:5217-5226. doi:10.4049/jimmunol.178.8.5217.
  106. Mueller H, Detjen AK, Schuck SD, et al. Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+, IFNgamma+, and TNFalpha+ multifunctional memory T cells coexpress GM-CSF. *Cytokine*. 2008;43(2):143-8. doi:10.1016/j.cyto.2008.05.002.
  107. Jacobsen M, Mattow J, Reipsilber D, Kaufmann SHE. Novel strategies to identify biomarkers in tuberculosis. *Biol Chem*. 2008;389(5):487-495. doi:10.1515/BC.2008.053.
  108. Randhawa P. Lymphocyte subsets in granulomas of human tuberculosis : An in situ immunofluorescence study using monoclonal antibodies. *Pathology*. 1990;22(3):153-155.
  109. Chambers TJ, Spector WG. Inflammatory Giant Cells. *Immunobiology*. 1982;161(3):283-289. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0171-2985(82)80084-3.
  110. Pinder SE, Colville A. Mycobacterial cervical lymphadenitis in children : can histological assessment help differentiate infections caused by non-tuberculous mycobacteria from Mycobacterium tuberculosis? *Histopathology*. 1993;22:59-64.
  111. Corpe R, Stergus I. IS THE HISTOPATHOLOGY OF NONPHOTOCHROMOGENIC MYCOBACTERIAL INFECTIONS DISTINGUISHABLE FROM THAT CAUSED BY MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS? *Am Rev Respir Dis*. 1963;87(2):289-291.
  112. Jones P, Campbell P. TUBERCULOUS LYMPHADENITIS IN CHILDHOOD : THE SIGNIFICANCE OF ANONYMOUS MYCOBACTERIA. *Br J Surg*. 1962;50(221):302-314.
  113. Kraus M, Benharroch D, Kaplan D, Leiberman A, Dima H, Shoham I. Mycobacterial cervical lymphadenitis : the histological features of non-tuberculous mycobacterial infection. *Histopathology*. 1999;35:534-538.
  114. Luster A, Unkeless J, Ravetch J.  $\gamma$ -Interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature*. 1985;315(20):672-676.
  115. Neville LF, Bagasras O. The Immunobiology of Interferon-gamma Inducible Protein 10 kD ( IP-10 ): a Novel , Pleiotropic Member of the C-X-C Chemokine Superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997;8(3):207-219.
  116. Rhoades ER, Cooper AM, Orme IANM. Chemokine Response in Mice Infected with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*. 1995;63(10):3871-3877.
  117. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible Programs of Chemokine Receptor Expression on Human Polarized T Helper 1 and 2 Lymphocytes. *J Exp Med*. 1998;187(6):875-883.
  118. Liu M, Guo S, Hibbert JM, et al. CXCL10 / IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(3):121-130. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.06.001.
  119. Dheda K, Van-Zyl Smit RN, Sechi LA, et al. Clinical Diagnostic Utility of IP-10 and LAM Antigen Levels for the Diagnosis of Tuberculous Pleural Effusions in a High Burden Setting. *PLoS One*. 2009;4(3):e4689. Available at: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004689>.
  120. Ruhwald M, Bjerregaard-Andersen M, Rabna P, Kofoed K, Eugen-Olsen J, Ravn P. CXCL10/IP-10 release is induced by incubation of whole blood from tuberculosis patients with ESAT-6, CFP10 and TB7.7. *Microbes Infect*. 2007;9(7):806-812. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2007.02.021.
  121. Alsleben N, Ruhwald M, Rüssmann H, Marx FM, Wahn U, Magdorf K. Interferon-gamma inducible protein 10 as a biomarker for active tuberculosis and latent tuberculosis infection in children: A case-control study. *Scand J Infect Dis*. 2012;44(4):256-262. doi:10.3109/00365548.2011.632644.
  122. Lane BR, Markovitz DM, Woodford NL, Rochford R, Strieter RM, Michael J. TNF- $\alpha$  Inhibits HIV-1 Replication in Peripheral Blood Monocytes and Alveolar Macrophages by Inducing the Production of RANTES and Decreasing C-C Chemokine Receptor 5 (CCR5) Expression. *J Immunol*. 1999;163:3653-3661.
  123. Vaddi K, Newton RC. Comparison of biological responses of human monocytes and THP-1 cells to chemokines of the intercrine-beta family. *J Leukoc Biol*. 1994;55(6):756-762. Available at: <http://www.jleukbio.org/content/55/6/756.abstract>.
  124. Taub DD, Conlon K, Lloyd AR, Oppenheim JJ, Kelvin DJ. Preferential Migration of Activated CD4 + and CD8 + T Cells in Response to MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$ . *Science (80- )*. 1992;260:355-358.
  125. Fahey TJ, Tracey KJ, Cousens LS, et al. Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function . Information about subscribing to The Journal of Immunology is online at: FUNCTION '. *J Immunol*. 1992;148:2764-2769.
  126. T. Schaberg, T. Bauer, S. Castell, K. Dalhoff, A. Detjen, R. Diel, U. Greinert, B. Hauer, C. Lange, K. Magdorf RL. Empfehlungen zur Therapie , Chemoprävention und Chemoprophylaxe der Tuberkulose im Erwachsenen- und Kindesalter \* Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose (DZK), Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP). *Pneumologie*. 2012;66:133-171.
  127. Adler H, Straub C, Frei R. Comparison of BacT / ALERT 3D , Lowenstein-Jensen medium and Middlebrook 7H10 / 7H11 biplate for recovering mycobacteria from clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005;24:499-500. doi:10.1007/s10096-005-1362-2.
  128. Schaad, UB, Votteler TP, McCracken GH NJ. Management of atypical mycobacterial lymphadenitis in childhood: a review based on 30 cases. *J Pediatr*. 1979;95:356-360.

129. Bruijnesteijn van Coppenraet ES, Lindeboom JA, Prins JM, PeetersMF, Claas EC KE. Real-time PCR assay using fine-needle aspirates and tissue biopsy specimens for rapid diagnosis of mycobacterial lymphadenitis in children. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2644-50.
130. Guld J, Bentzon MW, Bleiker MA, Griep WA, Magnusson M, Waaler H. Standardization of a new batch of purified tuberculin (PPD) intended for international use. *Bull World Health Organ.* 1958;19(5):845-951. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2537760/>.
131. Murphy K, Weaver C. *Janeway's Immunobiology - 9th Edition.* Taylor & Francis Ltd.; 2016.
132. American Thoracic Society. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:221-247.
133. Magdorf K. Tuberkulose im Kindesalter - Pathogenese, Prävention, Klinik und Therapie. *Monatsschrift Kinderheilkd.* 2006;154:124-132. doi:10.1007/s00112-005-1282-3.
134. Holden M, Dubin MR, Diamond PH. Frequency of Negative Intermediate-Strength Tuberculin Sensitivity in Patients with Active Tuberculosis. *N Engl J Med.* 1971;285(27):1506-1509. doi:10.1056/NEJM197112302852704.
135. Nash DR, Douglass JE. Anergy in Active Pulmonary Tuberculosis: A Comparison Between Positive And Negative Reactors And An Evaluation Of 5 TU And 250 TU Skin Test Doses. *Chest.* 1980;77(1):32-37. doi:<http://dx.doi.org/10.1378/chest.77.1.32>.
136. Rooney J, Crocco J, Kramer S, Lyons H. Further Observations on Tuberculin Reactions in Active Tuberculosis. *Am J Med.* 1976;60(April):517-522.
137. Caiaffa W, Graham N, Galai N, Rizzo R, Nelson K, Vlahov D. Instability of delayed-type hypersensitivity skin test anergy in human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med.* 1995;155(19):2111-2117. Available at: <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.1995.00430190107015>.
138. MADHI, SHABIR A. FCPAEDS; GRAY, GLENDA E. FCPAEDS; HUEBNER, ROBIN E. PHD; SHERMAN, GAYLE MMED (HAEM); MCKINNON, DIANE MBBCH; PETTIFOR JMP. Correlation between CD4+ lymphocyte counts, concurrent antigen skin test and tuberculin skin test reactivity in human immunodeficiency virus type 1-infected and -uninfected children with tuberculosis. *Pediatr Infect Dis J.* 1999;18(9):800-805.
139. Vallejo J, Ong L, Starke J. Clinical Features, Diagnosis and Treatment of Tuberculosis in Infants. *Pediatrics.* 1994;84(1):1-7.
140. Haimi-Cohen Y, Zeharia A, Mimouni M, Soukhman M, Amir J. Skin Indurations in Response to Tuberculin Testing in Patients with Nontuberculous Mycobacterial Lymphadenitis. *Clin Infect Dis.* 2001;33(11):1786-1788.
141. Harboe M. Antigens of PPD, Old Tuberculin, and Autoclaved Mycobacterium bovis BCG Studied.
142. Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberculous Lung Dis.* 2006;10(11):1192-1204.
143. Wang L, Turner MO, Elwood RK, Schulzer M, Fitzgerald JM. A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guérin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax.* 2002;57(March):804-809.
144. Reyn C Von, Horsburgh C. Skin test reactions to Mycobacterium tuberculosis purified protein derivative and Mycobacterium avium sensitin among health care workers and medical students in. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001;5(September):1122-1128.
145. von Reyn CF, Williams DE, Horsburgh CR, et al. Dual skin testing with Mycobacterium avium sensitin and purified protein derivative to discriminate pulmonary disease due to M. avium complex from pulmonary disease due to Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis.* 1998;177(3):730-6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9498455>.
146. Reyn CF Von, Green PA, McCormick D, et al. Dual Skin Testing with Mycobacterium avium Sensitin and Purified Protein Derivative: An Open Study of Patients with M. avium Complex Infection or Tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 1994;19:15-20.
147. Larsson L, Bentzon M, Lind A, et al. Sensitivity to sensitins and tuberculin in Swedish children. Part 5: a study of school children in an inland rural area. *Tuber Lung Dis.* 1993;74:371-376.
148. Lind A, Larsson L, Bentzon M, et al. Sensitivity children I. A study to sensitins and tuberculin in Swedish area of schoolchildren in an urban area. *Tubercle.* 1991;72:29-36.
149. Larsson L, Lind A, Skoogh B, et al. Sensitivity to sensitins and tuberculin children II. A study of preschool children. *Tubercle.* 1991;72:37-42.
150. J P, A G, C C, J C, JM E, P V. Reliability of tuberculin skin test measurement. *Ann Intern Med.* 1997;126(3):210-214. doi:10.7326/0003-4819-126-3-199702010-00005.
151. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet.* 2000;356:1099-1104.
152. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands IDA, Andersen P. Evidence for Occurrence of the ESAT-6 Protein in Mycobacterium tuberculosis and Virulent Mycobacterium bovis and for Its Absence in Mycobacterium bovis BCG. *Infect Immun.* 1996;64(1):16-22.
153. Berthet F, Rasmussen B, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT = 6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein ( CFP-10 ). *Microbiology.* 1998;144:3195-3203.
154. Sørensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen ÅSEB. Purification and Characterization of a Low-Molecular-Mass T-Cell Antigen Secreted by Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 1995;63(5):1710-1717.
155. Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part I. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006;6(3):413-422.
156. Pai M, Menzies D. Interferon- $\gamma$  Release Assays: What Is Their Role in the Diagnosis of Active Tuberculosis? *Clin Infect Dis.* 2007;44(1):74-77.
157. Piana F, Codeca LR, Cavallerio P, et al. Use of a T-cell-based test for detection of tuberculosis infection among immunocompromised patients. *Eur Respir J.* 2006;28(1):31-34. doi:10.1183/09031936.06.00110205.

158. Magdorf K, Schuck SD, Leitner S, Wahn U, Kaufmann SHE, Jacobsen M. T-cell responses against tuberculin and sensitin in children with tuberculosis and non-tuberculosis mycobacterial lymphadenopathy. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:1079-1083.
159. Steindor M, Nkwouano V, Mayatepek E, Mackenzie CR, Schramm D, Jacobsen M. Rapid Detection and Immune Characterization of Mycobacterium abscessus Infection in Cystic Fibrosis Patients. *PLoS One.* 2015;(March):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0119737.
160. Pluml G, Brenden M, Santos P, et al. Serum Antibody Reactivity to Recombinant mig and Whole Cell Antigens in Mycobacterium avium Infection \*. *Zentralblatt für Bakteriologie.* 1996;284:348-360. doi:10.1016/S0934-8840(96)80110-1.
161. Rolinck-Werninghaus C, Magdorf K, Stark K, et al. The potential of recombinant antigens ESAT-6, MPT63 and mig for specific discrimination of Mycobacterium tuberculosis and M. avium infection. *Eur J Pediatr.* 2003;162(7-8):534-6. doi:10.1007/s00431-003-1199-6.
162. Kitada S, Maekura R, Toyoshima N, et al. Use of Glycopeptidolipid Core Antigen for Serodiagnosis of Mycobacterium avium Complex Pulmonary Disease in Immunocompetent Patients. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(1):44-51. doi:10.1128/CDLI.12.1.44.
163. Kitada S, Kobayashi K, Ichiyama S, Takakura S, Sakatani M, Suzuki K. Serodiagnosis of Mycobacterium avium – Complex Pulmonary Disease Using an Enzyme Immunoassay Kit. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:793-797. doi:10.1164/rccm.200705-7710C.
164. Mitchison D. The Action of Antituberculosis Drugs in Short-Course Chemotherapy. *Tubercle.* 1985;66:219-225.
165. World Health Organization (WHO). *Rapid Advice: Treatment of tuberculosis in children.* Geneva: WHO Press; 2010.
166. World Health Organization (WHO). *Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children.* Second. Geneva: WHO Press; 2014.
167. World Health Organization (WHO). *Guidelines for the programmatic management of drug resistant tuberculosis - 2011 Update.* Geneva: WHO Press; 2011.
168. Somocurcio JG, Sotomayor A, Shin S, Portilla S, Valcarcel M, Guerra D. Surgery for patients with drug-resistant tuberculosis: report of 121 cases receiving community-based treatment in Lima, Peru. *Thorax.* 2007;62:416-421. doi:10.1136/thx.2005.051961.
169. Ormerod LP. Role of surgery in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis. *Thorax.* 2007;62. doi:10.1136/thx.2005.056135.
170. Corpe RF. Surgical Management of Pulmonary Disease Due to Mycobacterium avium-intracellulare. *Rev Infect Dis.* 1981;3(5):1064-1067.
171. Moran JF, Alexander LG, Staub EW, Young WG, Sealy WC. Long-term Results of Pulmonary Resection for Atypical Mycobacterial Disease. *Ann Thorac Surg.* 1983;35(6):597-604. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975(10)61069-7.
172. Pomerantz M, Madsen L, Goble M, Iseman M. Surgical management of resistant Mycobacterial tuberculosis and other mycobacterial pulmonary infections. *Ann Thorac Surg.* 1991;52(5):1108-1112. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0003-4975(91)91289-8.
173. Nelson KG, Griffith DE, Brown BA, Wallace Jr RJ. Results of operation in Mycobacterium avium-intracellulare lung disease. *Ann Thorac Surg.* 1998;66(2):325-329. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0003-4975(98)00401-9.
174. Shiraishi Y, Nakajima Y, Takasuna K, Hanaoka T, Katsuragi N, Konno H. Surgery for Mycobacterium avium complex lung disease in the clarithromycin era. *Eur J Cardio-Thoracic Surg.* 2002;21:314-318.
175. Castro D, Hoover L, Zuckerbraun L. Cervical mycobacterial lymphadenitis: Medical vs surgical management. *Arch Otolaryngol.* 1985;111(12):816-819. doi:10.1001/archotol.1985.00800140060011.
176. Lindeboom J a, Kuijper EJ, Bruijnesteijn van Coppenraet ES, Lindeboom R, Prins JM. Surgical excision versus antibiotic treatment for nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children: a multicenter, randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis.* 2007;44(8):1057-64. doi:10.1086/512675.
177. Lindeboom J a H. Surgical treatment for nontuberculous mycobacterial (NTM) cervicofacial lymphadenitis in children. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70(2):345-8. doi:10.1016/j.joms.2011.02.034.
178. Hazra R, Robson CD, Perez-Atayde a R, Husson RN. Lymphadenitis due to nontuberculous mycobacteria in children: presentation and response to therapy. *Clin Infect Dis.* 1999;28(1):123-129. doi:10.1086/515091.
179. Lindeboom J a, Lindeboom R, Bruijnesteijn van Coppenraet ES, Kuijper EJ, Tuk J, Prins JM. Esthetic outcome of surgical excision versus antibiotic therapy for nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(11):1028-30. doi:10.1097/INF.0b013e3181aa6411.
180. Lindeboom J a. Conservative wait-and-see therapy versus antibiotic treatment for nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children. *Clin Infect Dis.* 2011;52(2):180-4. doi:10.1093/cid/ciq070.
181. Zeharia A, Eidlitz-Markus T, Haimi-Cohen Y, Samra Z, Kaufman L, Amir J. Management of nontuberculous mycobacteria-induced cervical lymphadenitis with observation alone. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27(10):920-2. doi:10.1097/INF.0b013e3181734fa3.
182. Feske M, Nudelmann RJ, Medina M, et al. Enhancement of human antigen-specific memory T-cell responses by interleukin-7 may improve accuracy in diagnosing tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15(10):1616-1622. doi:10.1128/CVI.00185-08.
183. Dinter A, Berger EG. Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol.* 1998;109(5-6):571-590. doi:10.1007/s004180050256.
184. Schuck SD, Mueller H, Kunitz F, et al. Identification of T-cell antigens specific for latent mycobacterium tuberculosis infection. *PLoS One.* 2009;4(5):e5590. doi:10.1371/journal.pone.0005590.
185. Cehovin A, Cliff JM, Hill PC, Brookes RH, Dockrell HM. Extended Culture Enhances Sensitivity of a Gamma Interferon Assay for Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(6):796-798.

- doi:10.1128/CVI.00093-07.
186. Leyten EMS, Arend SM, Prins C, Cobelens FGJ, Ottenhoff THM, Dissel JT Van. Discrepancy between Mycobacterium tuberculosis -Specific Gamma Interferon Release Assays Using Short and Prolonged In Vitro Incubation. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(7):880-885. doi:10.1128/CVI.00132-07.
  187. Sester U, Fousse M, Dirks J, et al. Whole-Blood Flow-Cytometric Analysis of Antigen- Specific CD4 T-Cell Cytokine Profiles Distinguishes Active Tuberculosis from Non-Active States. 2011;6(3):2-8. doi:10.1371/journal.pone.0017813.
  188. Streitz M, Fuhrmann S, Powell F, et al. Tuberculin-specific T cells are reduced in active pulmonary tuberculosis compared to LTBI or status post BCG vaccination. *J Infect Dis.* 2011;203(3):378-382. doi:10.1093/infdis/jiq065.
  189. Lein AD, Reyn CF Von, Ravn P, et al. Cellular Immune Responses to ESAT-6 Discriminate between Patients with Pulmonary Disease Due to Mycobacterium avium Complex and Those with Pulmonary Disease Due to Mycobacterium tuberculosis Cellular Immune Responses to ESAT-6 Discriminate between Patient. 1999.
  190. Mollenkopf HJ, Grode L, Mattow J, et al. Application of Mycobacterial Proteomics to Vaccine Design : Improved Protection by Mycobacterium bovis BCG Prime-Rv3407 DNA Boost Vaccination against Tuberculosis. *Infect Immun.* 2004;72(11):6471-6479. doi:10.1128/IAI.72.11.6471.
  191. Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf H, et al. Comparative proteome analysis of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG strains : towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol.* 1999;33(6):1103-1117.
  192. Latorre I, Diaz J, Mialdea I, Serra-Vidal M. IP-10 is an accurate biomarker for the diagnosis of tuberculosis in children. *J Infect.* 2014;69:590-599. doi:10.1016/j.jinf.2014.06.013.
  193. Ruhwald M, Dominguez J, Latorre I, et al. A multicentre evaluation of the accuracy and performance of IP-10 for the diagnosis of infection with M . tuberculosis. *Tuberculosis.* 2011;91:260-267. doi:10.1016/j.tube.2011.01.001.
  194. Aabye MG, Ruhwald M, PrayGod G, et al. Potential of interferon-c-inducible protein 10 in improving tuberculosis diagnosis in HIV-infected patients. *Eur Respir J.* 2010;36(6):1488-1490.
  195. Kabeer B, Raman B, Thomas A, Perumal V. Role of QuantiFERON-TB Gold , Interferon Gamma Inducible Protein-10 and Tuberculin Skin Test in Active Tuberculosis Diagnosis. *PlosOne.* 2010;5(2):1-7. doi:10.1371/journal.pone.0009051.
  196. Whittaker E, Gordon A, Kampmann B. Is IP-10 a Better Biomarker for Active and Latent Tuberculosis in Children than IFN-gamma ? *PlosOne.* 2008;3(12):1-6. doi:10.1371/journal.pone.0003901.
  197. Lighter J, Rigaud M, Huie M, Peng C, Pollack H. Chemokine IP-10 : an adjunct marker for latent tuberculosis infection in children. *Int J Tuberculosis Lung Dis.* 2009;13(6):731-736.
  198. Hong J, Lee H, Kim S, et al. Efficacy of IP-10 as a biomarker for monitoring tuberculosis treatment. *J Infect.* 2014;68:252-258. doi:10.1016/j.jinf.2013.09.033.
  199. Wallace RJ, Brown BANN, Griffith DE, Girard WM, Murphy DT. Clarithromycin Regimens for Pulmonary Mycobacterium avium Complex The First 50 Patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;153:1766-1772.
  200. Griffith DE, Brown BA, Girard WM, Murphy DT, Wallace RJ. Azithromycin Activity Against Mycobacterium avium Complex Lung Disease in Patients Who Were Not Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Clin Infect Dis.* 1996;23:983-989.
  201. Ruhwald M, Petersen J, Kofoed K, et al. Improving T-Cell Assays for the Diagnosis of Latent TB Infection : Potential of a Diagnostic Test Based on IP-10. *PlosOne.* 2008;3(8):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0002858.

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Marc Jacobsen für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für die Überlassung des Arbeitsplatzes, sowie dieses Projektes und für die unermüdliche Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Jacobsen, welche mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben – allen voran Frau Annette Seibt und Herrn Dr. Malte Kohns für ihre ständige Diskussionsbereitschaft, Ermutigungen, Beratung und Hilfe im Labor.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Colin R. MacKenzie für die Bereitschaft sich als Gutachter dieser Dissertation und als Prüfungsmitglied für die anschließende Disputation zur Verfügung gestellt zu haben.

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. Ertan Mayatepek und allen Mitgliedern der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Neonatologie und Kinderkardiologie für die Unterstützung und Anregungen in den Ambulanzen und auf den Stationen.