

Aus dem Bereich Klinische Medizin
Fachrichtung Infektionsmedizin
Abteilung für Transplantations- und Infektionsimmunologie
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Evaluation einer neuen Generation der *Interferon- γ Release Assays* in
immunsupprimierten Patientengruppen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von

Hanna-Elisa Spohn

geb. am 14.01.1994 in Wadern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Zusammenfassung	7
2 Einleitung.....	11
2.1 Das Immunsystem	11
2.1.1 Antigenpräsentation	11
2.1.2 T- und B-Lymphozyten.....	12
2.1.3 Die Rolle von IFN- γ	13
2.2 Einführung Mykobakterien	14
2.3 Immunpathogenese einer Infektion mit <i>M. tuberculosis</i>	14
2.4 Definition latente und aktive Tuberkulose	16
2.5 Medikamentöse Prävention und Therapie der Tuberkulose	17
2.6 Personen mit erhöhtem Tuberkuloserisiko.....	18
2.6.1 Patienten mit chronischer Nierenerkrankung und Dialysebehandlung	18
2.6.2 Patienten nach Nierentransplantation.....	19
2.6.3 Patienten nach Stammzelltransplantation.....	20
2.6.4 Patienten mit rheumatischen Erkrankungen.....	20
2.7 Diagnostik der aktiven Tuberkulose.....	21
2.8 Diagnostik der LTBI	22
2.8.1 Indirekte Nachweismethoden.....	22
2.8.2 <i>In vitro</i> Diagnostik	23
2.8.3 Alternative Screeningverfahren.....	24
2.9 Ziele der Arbeit	26
3 Material und Methoden	27
3.1 Probandenpopulation.....	27
3.2 Geräte und Materialien.....	30
3.3 Durchführung des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests	33
3.4 Bildung der Differenz zwischen dem TB-2- und TB-1-Röhrchen	37

3.4.1	Berechnung der Sensitivität, Spezifität und des positiv prädiktiven Wertes.....	38
3.4.2	<i>Follow-up</i>	38
3.5	Durchflusszytometrie	38
3.5.1	Stimulation der Immunzellen.....	39
3.5.2	Intrazelluläre Zellfärbung.....	40
3.5.3	Messung und Auswertung.....	41
3.6	Statistische Auswertung	45
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Überblick Patientenkollektiv	45
4.2	Überblick über die QuantiFERON-TB Gold Plus Ergebnisse	46
4.3	Gruppenspezifische Auswertung des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests.....	47
4.3.1	TB-1- und TB-2-Röhrchen spezifische Auswertung und Korrelation	51
4.3.2	Einteilung nach QuantiFERON-TB Gold Plus Ergebnissen	54
4.4	Logistische Regression.....	57
4.5	Differenz des TB-2- und TB-1-Röhrchens.....	61
4.6	Sensitivität, Spezifität und positiv prädiktiver Wert	62
4.7	Charakterisierung der reaktiven T-Zellen mittels Durchflusszytometrie	63
4.7.1	Korrelation Durchflusszytometrie und QuantiFERON-TB Gold Plus Test.....	66
4.7.2	Stimulationsspezifische durchflusszytometrische Auswertung innerhalb der	
	Probandengruppen.....	71
4.7.3	Stimulationsspezifische durchflusszytometrische Auswertung anhand des.....	
	QuantiFERON-TB Gold Plus Testergebnisses	75
4.8	<i>Follow-up</i>	79
5	Diskussion	80
5.1	Evaluation des Studienkollektivs	81
5.2	Ergebnisse des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests	81
5.2.1	Unschlüssige Ergebnisse	81
5.2.2	Positive und negative Testergebnisse.....	82
5.2.3	Diskordante Ergebnisse.....	83

5.2.4	Logistische Regression.....	84
5.2.5	Spezifität und Sensitivität.....	85
5.2.6	Differenz des TB-2- und TB-1-Röhrchens und positiv prädiktiver Wert	86
5.3	Durchflusszytometrische Analyse des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests	87
5.3.1	Durchflusszytometrischer Vergleich der T-Zellreaktionen der einzelnen Probandengruppen.....	87
5.3.2	ESAT-6 als potenzielles prognostisches Antigen zur Differenzierung zwischen LTBI und aTB	89
5.4	<i>Follow-up</i>	89
5.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	90
6	Literaturverzeichnis	92
7	Abbildungsverzeichnis	101
8	Tabellenverzeichnis	103
9	Publikationen	104
10	Danksagung	105
11	Lebenslauf	106

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
γ	gamma
APC	antigenpräsentierende Zellen
aTB	Patienten mit aktiver Tuberkuloseerkrankung
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BFA	Brefeldin A
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFP-10	<i>culture filtrate protein 10</i>
CRF	<i>chronic renal failure</i> /Dialysepatienten
DL	Detektionslimit
DMARD	<i>Disease Modifying Antirheumatic Drugs</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbant Assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme-linked Immunospot Assay</i>
ESAT-6	<i>early secretory antigenic target 6</i>
FACS	<i>fluorescence-activated-cell-sorter</i>
FCS	fetales Kälberserum
FSC	<i>Forward Scatter</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IFN	Interferon
IGRA	<i>Interferon-Gamma Release Assay</i>
IL	Interleukin
INH	Isoniazid
IQR	Interquartilsabstand
LT	Lymphotoxin

LTBI	latente Tuberkuloseinfektion
M.	Mycobakterium
MDR-TB	Multiresistente Tuberkulose
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Komplex
mTOR	<i>mammalian (mechanistic) target of rapamycin</i>
NaN ₃	Natriumazid
NAT	Nukleinsäureamplifikationstest
N ₀	Stickstoffmonoxid
NTM	nicht-tuberkulöse Mykobakterien
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PFA	Paraformaldehyd
PPD	<i>purified protein derivate</i>
RA	Patienten, die an Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises leiden
RD-1	<i>region of difference 1</i>
SCTR	stammzelltransplantierte Patienten
SEB	Staphylococcus aureus Enterotoxin B
SEE	Staphylococcus aureus Enterotoxin E
SOTR	solide organtransplantierte Patienten
SSC	<i>Side Scatter</i>
SSI	<i>Statens Serum Institut</i>
STIKO	Ständige Impfkommission
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TST	Tuberkulinhauttest
WHO	Weltgesundheitsorganisation
XDR-TB	extrem arzneimittelresistente Tuberkulose

1 Zusammenfassung

Tuberkulose ist die zweittödlichste infektiöse Erkrankung und zählt zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat eine *End TB Strategy* entwickelt, in der bis 2035 die Sterberate an Tuberkulose um 35 % und die Inzidenzrate um 90 % im Vergleich zu 2015 gesenkt werden sollen. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen zahlreiche medizinische Weiterentwicklungen erfolgen, unter anderem im Bereich der Diagnostik. Bisher zählt der direkte Erregernachweis des *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) als Goldstandard in der Diagnostik einer aktiven Tuberkulose. Zum Nachweis einer latenten Tuberkuloseinfektion (LTBI) dienen indirekte Nachweisverfahren wie der Tuberkulinhauttest (TST) und der *Interferon-Gamma Release Assay* (IGRA). Testverfahren, die einerseits eine sichere Differenzierung zwischen einer LTBI und einer aktiven Tuberkuloseerkrankung erlauben und andererseits die Wahrscheinlichkeit der Progression einer LTBI zu einer aktiven Tuberkulose vorhersagen können, werden dringend benötigt, um die Therapiestrategien für Patienten zu optimieren. Eine neue Generation der IGRAs, der QuantiFERON-TB Gold Plus Test soll durch ein zusätzliches Röhrchen (TB-2) nicht nur CD4-T-Zellen, sondern auch CD8-T-Zellen zur Interferon-gamma- (IFN- γ) Produktion stimulieren. Die Differenz der Röhrchen würde demnach die CD8-T-Zellantwort repräsentieren. Diese wiederum soll einerseits als Surrogatmarker einer aktiven Tuberkulose beziehungsweise der Progression einer LTBI zu einer aktiven Tuberkulose dienen und andererseits die Sensitivität und Spezifität des Testverfahrens bei Patienten mit supprimierten CD4-T-Zellen steigern. Das Ziel dieser Arbeit war die Evaluation des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests in verschiedenen immunsupprimierten Probandengruppen hinsichtlich seiner Spezifität und Sensitivität, der Differenz der beiden Röhrchen sowie der Quantifizierung der reagierenden T-Zellen in der Durchflussszytometrie.

Die dafür 448 eingeschlossenen Studienteilnehmer setzten sich aus 84 Kontrollen, elf Patienten mit aktiver Tuberkuloseerkrankung (aTB) und 353 immunsupprimierten Personen zusammen. Wir konnten zeigen, dass der QuantiFERON-TB Gold Plus Test mit einer Spezifität von 94,5 %, einer Sensitivität von 90,9 % sowie einer geringen Anzahl an unschlüssigen Befunden (1,11 %) ebenfalls bei immunsupprimierten Menschen als sicheres diagnostisches Mittel zum Nachweis einer LTBI angewendet werden kann. Beim Vergleich der Höhe der IFN- γ -Antworten aller als positiv getesteten Probanden ergaben sich in unseren Untersuchungen sowohl für das TB-1- ($p=0,6174$) als auch für das TB-2-Röhrchen ($p=0,6654$) keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollpersonen, aTB und den immunsupprimierten Probanden. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die beiden Röhrchen sehr gut miteinander korrelierten (Korrelationsindex nach Spearman $r=0,7443$), ohne dass sich ein signifikanter Unterschied in der Differenz des TB-2- und TB-1-Röhrchens zwischen Patienten mit aktiver und latenter Tuberkulose nachweisen ließ ($p=0,69$). Anhand des Fragebogens konnte evaluiert werden, dass die Patienten mit LTBI, die eine erhöhte Differenz aufwiesen, nicht wissentlich einen kürzlichen Kontakt zu einem aTB hatten. Zudem zeigte das *Follow-up* keine Tuberkuloseentwicklung bei diesen Patienten.

Zur quantitativen und qualitativen Differenzierung der reagierenden T-Zellen der beiden Röhren wurde zusätzlich eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Dort konnte bewiesen werden, dass einerseits vor allem die CD4-T-Zellen IFN- γ in beiden Röhren produzierten und dass sich andererseits in beiden Röhren die CD4- und CD8-T-Zellantworten nicht signifikant voneinander unterschieden ($p > 0,99$). Beim Vergleich der reagierenden Zellen zwischen den Probandengruppen stellte sich weder für die CD4-T-Zellen noch für die CD8-T-Zellen im TB-1- ($p = 0,2430$ und $p = 0,8185$) und TB-2-Röhren ($p = 0,5646$ und $p = 0,8985$) eine signifikante Divergenz heraus. In der Durchflusszytometrie wurden neben der Stimulation mit den TB-1- und TB-2-Antigenen zusätzlich Stimulationen mit PPD, ESAT-6, CFP-10 und SEB/SEE durchgeführt. Interessanterweise zeigten lediglich die IFN- γ produzierenden CD8-T-Zellen auf den Stimulus ESAT-6 eine signifikante Unterscheidung in der Höhe der IFN- γ -Produktion zwischen aTB und gesunden Probanden ($p = 0,0117$) und Personen mit LTBI ($p = 0,0037$).

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass sich der QuantiFERON-TB Gold Plus Test als diagnostisches Mittel zur Detektion einer LTBI ebenfalls bei immunsupprimierten Patienten eignet. Entgegen den Erwartungen stellte sich in unserem Patientenkollektiv keine erhöhte IFN- γ -Produktion durch CD8-T-Zellen im TB-2-Röhren bei aTB dar. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich die CD4- und CD8-T-Zellantwort in den beiden Röhren bei allen positiv getesteten Probanden in den verschiedenen Probandengruppen nicht signifikant voneinander unterschied. Daher lieferte die Differenz der Röhren keine Hinweise auf Unterschiede zwischen den Patientengruppen und keine darauf, welche Patienten ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer aktiven Tuberkulose hatten. Deshalb kann die Differenz nicht als Surrogatmarker einer aktiven Tuberkulose oder einer Progression von einer LTBI zu einer aktiven Tuberkulose genutzt werden. Die Hinzugabe von ESAT-6 Peptiden in ein weiteres Röhren könnte gegebenenfalls in Zukunft vorhersagen, welche Patienten mit LTBI ein erhöhtes Progressionsrisiko zu einer aktiven Tuberkuloseerkrankung haben und damit die Diagnostik und die Präventivtherapien revolutionieren.

Summary

Tuberculosis is the second deadliest infectious disease and is one of the leading causes of death worldwide. The World Health Organization (WHO) has developed an *End TB Strategy*, which aims to reduce the mortality rate from tuberculosis by 35 % and the incidence rate by 90 % by 2035 compared to 2015. Achieving this goal will require numerous medical developments, including in the field of diagnostics. Until now, the direct detection of the pathogen *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) has been the gold standard in the diagnosis of active tuberculosis. Indirect detection methods such as the tuberculin skin test (TST) and the interferon-gamma release assay (IGRA) are used to detect a latent tuberculosis infection (LTBI). Test procedures that allow a reliable differentiation between LTBI and active tuberculosis on the one hand and can predict the probability of progression from LTBI to active tuberculosis on the other hand are urgently needed in order to optimize treatment strategies for patients. A new generation of IGRAs, the QuantiFERON-TB Gold Plus Test, is designed to stimulate not only CD4-T-cells but also CD8-T-cells to produce interferon-gamma (IFN- γ) through an additional tube (TB-2). The difference between the tubes would therefore represent the CD8-T-cell-response. The CD8-T-cell-response is intended to serve as a surrogate marker of active tuberculosis or the progression of LTBI to active tuberculosis and to increase the sensitivity and specificity of the test procedure in patients with suppressed CD4-T-cells. The aim of this study was the evaluation of the QuantiFERON-TB Gold Plus Test in various immunosuppressed groups with regard to its specificity and sensitivity, the difference between the two tubes and the quantification of the reacting T-cells in flow cytometry.

The 448 recruited study participants consisted of 84 controls, eleven patients with active tuberculosis (aTB) and 353 immunosuppressed individuals. We were able to show that the QuantiFERON-TB Gold Plus Test with a specificity of 94.5 %, a sensitivity of 90.9 % and a low number of indeterminate results (1.11 %) can also be used as a reliable diagnostic tool for the detection of LTBI in immunosuppressed people. When comparing the level of IFN- γ responses of all test subjects who tested positive, our study revealed no significant differences between control persons, aTB and the immunosuppressed subjects for the TB-1 ($p=0,6174$) and for the TB-2-tube ($p=0,6654$). Our results showed that the two tubes correlated very well with each other (Spearman's correlation index $r=0,7443$). There was no evidence of statistical significance in the difference between the TB-2-and TB-1-tubes in patients with active and latent tuberculosis ($p=0,69$). The questionnaire was used to evaluate that the patients with LTBI who showed an increased difference did not knowingly have recent contact with aTB. In addition, the follow-up showed no development of tuberculosis in these patients.

For quantitative and qualitative differentiation of the reacting T-cells in both tubes, flow cytometry was also performed. This showed that, on the one hand, the CD4-T-cells in particular produced IFN- γ in both tubes and that, on the other hand, the CD4- and CD8-T-cell-responses in both tubes did not differ significantly from each other ($p>0,99$). When comparing the responding cells between the subject

groups, there was no significant divergence for either the CD4-T-cells or the CD8-T-cells in the TB-1- (p=0,2430 and p=0,8185) and TB-2-tube (p=0,5646 and p=0,8985). In flow cytometry, in addition to stimulation with the TB-1 and TB-2 antigens, stimulations with PPD, ESAT-6, CFP-10 and SEB/SEE was also performed. Interestingly, only the IFN- γ producing CD8-T-cells on the stimulus ESAT-6 showed a significant difference in the level of IFN- γ production between aTB and healthy subjects (p=0,0117) and subjects with LTBI (p=0,0037).

In summary, the QuantiFERON-TB Gold Plus test is also suitable as a diagnostic tool for the detection of LTBI in immunosuppressed patients. Contrary to expectations, there was no increased IFN- γ production by CD8-T-cells in the TB-2-tube in aTB in our patient collective. In addition, it could be shown that the CD4- and CD8-T-cell-response in the two tubes did not differ significantly from each other in all subjects tested positive in the different study groups. Therefore, the difference in the tubes provided no indication of differences between the patient groups and no indication of which patients had an increased risk of developing active tuberculosis. Therefore, the difference in the tubes cannot be used as a surrogate marker of active tuberculosis or progression from LTBI to active tuberculosis. The addition of ESAT-6 peptides to another tube could possibly predict in the future which patients with LTBI have an increased risk of progression to active tuberculosis. This would revolutionize diagnostics and preventive therapies.

2 Einleitung

Mumifizierte Körper und Wandmalereien aus dem alten Ägypten legen nahe, dass das Krankheitsbild der Tuberkulose, auch unter den Namen Schwindsucht oder weiße Pest bekannt, bereits seit Jahrtausenden existiert [1]. Der Nachweis des *M. tuberculosis* gelang allerdings erst am 24. März 1882 durch Robert Koch [2]. 1908 entwickelten Albert Calmette und Camille Guérin den *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) Bacille Calmette-Guérin (BCG) Impfstoff in Frankreich [3]. Diese Errungenschaft und die Entdeckung von Streptomycin als antituberkulöses Antibiotikum schürten zunächst Hoffnungen, die Krankheit Tuberkulose rasch zu besiegen [4]. Die schnelle Entwicklung von Antibiotikaresistenzen und die Veröffentlichung von Studien zur eingeschränkten Wirksamkeit der Impfung führten allerdings dazu, dass die WHO Tuberkulose im Jahr 1994 zum globalen Notfall erklärte [5, 6].

1,3 Millionen Menschen starben 2022 gemäß dem *Global Tuberculosis Report 2023* der WHO an Tuberkulose [7]. Die Krankheit zählt damit zu den häufigsten Todesursachen weltweit und war bis zur Corona-Pandemie verantwortlich für die meisten tödlichen infektiösen Erkrankungen [7]. Fast ein Viertel der Weltbevölkerung soll latent mit Tuberkulose infiziert sein [8]. In Deutschland lag die Zahl der Neuinfektionen im Jahr 2022 bei 4076, was einer Inzidenz von 4,9 pro 100.000 Menschen entspricht [9]. Aufgrund dieser Brisanz hat sich die WHO in ihrer *End TB Strategy* zum Ziel gesetzt, die Sterberate an Tuberkulose bis 2035 im Vergleich zu 2015 um 95 % zu senken und die Inzidenzrate um 90 % zu reduzieren. Einen Meilenstein stellte dabei das Jahr 2020 dar, in dem die Inzidenzrate um 20 % und die Sterberate um 35 % niedriger sein sollten als 2015. Weltweit betrachtet zeigte sich jedoch lediglich ein Rückgang der Inzidenz um 11 % und der Sterblichkeit um 9,2 % [10]. Um die Entwicklung zu forcieren, bedarf es somit einer verbesserten Prävention, einer adäquaten Diagnostik sowie geeigneter Therapieverfahren.

2.1 Das Immunsystem

2.1.1 Antigenpräsentation

Die Zellen des Immunsystems entstehen alle aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Diese entwickeln sich einerseits weiter zu lymphatischen Vorläuferzellen, aus denen die B- und T-Zellen sowie die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) hervorgehen und andererseits zu myeloiden Vorläuferzellen, die die Grundlage für Granulozyten und Makrophagen sowie Thrombozyten und Erythrozyten bilden [11].

Gelingt es einem Erreger, die natürlichen Barrieren des Körpers zu überwinden und in diesen einzudringen, wird dieser zunächst unspezifisch durch die Zellen des angeborenen Immunsystems bekämpft. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die Phagozyten, zu denen Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten gehören. Eine ihrer Aufgaben besteht darin, eine Entzündungsreaktion auszulösen, wodurch über Zytokine weitere Zellen zum Infektionsherd gelockt werden können. Als

Zytokine werden Proteine bezeichnet, die die Eigenschaft besitzen, eine Signalübertragung zwischen verschiedenen Zellen zu induzieren [11]. Eine weitere Aufgabe der Makrophagen und dendritischen Zellen stellt die Antigenpräsentation dar, die auch durch B-Lymphozyten erfolgt. Die Antigenpräsentation zählt als Bindeglied zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort. Sie erfolgt durch die Zellen des angeborenen Immunsystems mithilfe der Glykoproteine *Major Histocompatibility Complex*- (MHC) Moleküle. Ein Hauptunterschied der verschiedenen MHC-Moleküle besteht in der Herkunft der präsentierten Antigene. MHC-Klasse-I-Moleküle binden vor allem fremde Peptide des Zytosols, MHC-Klasse-II-Moleküle hingegen vor allem jene, die von exogenen Pathogenen stammen und zunächst durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden müssen. Die Antigenpräsentation verläuft je nach MHC-Molekül-Klasse unterschiedlich. Bevor das Antigen mit dem MHC-Klasse-I-Molekül interagieren kann, müssen die zytosolischen Proteine zunächst fragmentiert werden, was unter anderem im Proteasom stattfindet. Die zerkleinerten Peptidfragmente werden dann über den Antigenpeptid-Transporter in das endoplasmatische Retikulum geschleust, wo das Peptid an sein passendes MHC-I-Molekül binden kann. Diese Verbindung wird über verschiedene Zwischenschritte in ein Vesikel verpackt und gelangt anschließend über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche [11]. Erreger, welche sich in intrazellulären Vesikeln vermehren oder die über Endozytose aufgenommen wurden, können in der Regel nicht durch das Proteasom abgebaut werden. Um die Pathogene dennoch eliminieren zu können, sinkt in diesem Fall der pH-Wert der Endosomen ab. Dadurch werden die in den Vesikeln enthaltenen Proteasen aktiviert und die Pathogene können fragmentiert werden. MHC-Klasse-II-Moleküle können nun in die angesäuerten Endosomen eindringen und eine Bindung mit den passenden Antigenfragmenten eingehen. Der Peptid-MHC-Klasse-II-Komplex erreicht als Vesikel die Zelloberfläche [11]. Naive T-Zellen können dann über ihren T-Zell-Rezeptor die Peptid-MHC-Klasse-I- oder Klasse-II-Komplexe an den Zelloberflächen erkennen. Dabei interagiert das MHC-Klasse-I-Molekül immer mit dem Rezeptor von T-Helfer-Zellen (T_H-Zellen) und dem Corezeptormolekül *cluster of differentiation* (CD) 4 und die MHC-Klasse-II-Moleküle mit dem T-Zell-Rezeptor von zytotoxischen T-Zellen und deren Corezeptormolekül CD8 [11]. Um aktiviert werden zu können, benötigt die naive T-Zelle zusätzlich ein costimulierendes Signal. Dabei handelt es sich beispielsweise um ein Molekül wie das B7 Molekül auf antigenpräsentierenden Zellen (APC), das mit einem passenden Rezeptor, in diesem Fall dem CD28-Rezeptor, auf der T-Zelle interagieren muss. Durch diese Interaktion beginnt die Aktivierung der naiven T-Zelle, die zur T-Effektorzelle differenziert.

2.1.2 T- und B-Lymphozyten

Durch die zuvor beschriebene Aktivierung wird die T-Zelle zunächst zur Vermehrung und entsprechender Differenzierung angeregt. Dabei spielt die Costimulation durch verschiedene Zytokine eine entscheidende Rolle. Einen essenziellen Bestandteil für das Überleben, die Proliferation sowie die Differenzierung der naiven T-Zelle zur T-Effektorzelle stellen vor allem die Zytokine Interleukin- (IL)

2 sowie der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) dar [11]. Eine naive CD8-T-Zelle entwickelt sich immer zu einer zytotoxischen T-Zelle. Die Hauptaufgabe einer zytotoxischen Zelle besteht darin, in den Zellen, die sie erkennt, den programmierten Zelltod über zytotoxische Granula und den darin enthaltenen zytotoxischen Proteinen auszulösen [11]. Des Weiteren exprimieren CD8-T-Zellen unter anderem die Zytokine TNF- α und IFN- γ , die einen wichtigen Bestandteil der Immunantwort bilden. Die CD4-T-Zellen hingegen können sich nach der Aktivierung zu unterschiedlichen Effektorzellen differenzieren. Die zwei wichtigsten Untergruppen bilden dabei die TH1- und TH2-Zellen, die sich zunächst durch die Produktion ihrer Zytokine unterscheiden. TH1-Zellen exprimieren vor allem IFN- γ und IL-12, wohingegen TH2-Zellen hauptsächlich IL-4 und IL-5 produzieren [11]. Eine wichtige Rolle der TH1-Zellen stellt die Aktivierung von Makrophagen dar, die vor allem mithilfe des Zytokins IFN- γ , aber auch durch TNF- α vollzogen werden kann. Danach gelingt es Makrophagen, Pathogene abzutöten, die zuvor den Abwehrmechanismen entkommen konnten. Des Weiteren sezernieren TH1-Zellen costimulierende Signale und interagieren mit B-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten werden vor allem von TH2-Zellen aktiviert, wenn sie an ihrem B-Zell-Rezeptor ein Antigen gebunden haben, das gleichzeitig auch durch den T-Zell-Rezeptor erkannt wird. Diese Aktivierung führt zur klonalen Expansion der B-Lymphozyten, die sich weiter zu Plasmazellen differenzieren und Antikörper produzieren. Antikörper dienen der humoralen Immunantwort durch Neutralisation von Antigenen wie beispielsweise von Viren, Bakterien oder auch von Blutgruppenantigenen. Des Weiteren führen sie zu ihrer Opsonierung und der Aktivierung des Komplementsystems. Aktivierte B-Zellen können wiederum durch Peptid-Präsentationen über MHC-Komplexe weitere T-Zellen aktivieren. Die Besonderheit des adaptiven Immunsystems besteht in der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses von sowohl T- als auch B-Gedächtniszellen nach Antigenkontakt. Bei einer erneuten Infektion können diese Zellen direkt klonal expandieren, ohne vorher eine Aktivierung zu durchlaufen, wodurch eine sehr schnelle und vor allem gezielte Immunantwort entsteht.

2.1.3 Die Rolle von IFN- γ

Das Zytokin IFN- γ wird vor allem von TH1-Zellen, CD8-T-Zellen, NK-Zellen und dendritischen Zellen sezerniert und beeinflusst auf vielfältige Weise die Immunantwort. Einerseits wirkt sich die IFN- γ -Sekretion der Zellen des angeborenen Immunsystems auf die Rekrutierung von weiteren Immunzellen zum Entzündungsherd aus, andererseits auf die Differenzierung von naiven CD4-T-Zellen zu ihren T-Effektorzellen. Eine der wichtigsten Wirkungen stellt die Makrophagenaktivierung dar, die der Abtötung von intrazellulären Erregern dient. Dabei wird unter anderem die Produktion von Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid (NO) gesteigert. Ebenso wichtig ist die durch IFN- γ induzierte vermehrte Expression von MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen, wodurch die Antigenpräsentation verbessert werden kann. Des Weiteren unterstützt IFN- γ die B-Zell-Differenzierung und die Aktivierung von NK-Zellen. Eine weitere wichtige Aufgabe besteht in der

direkten Hemmung der Replikation von Viren. IFN- γ wirkt sich ebenso immunmodulierend aus, indem es das Wachstum von TH2-Zellen hemmt.

2.2 Einführung Mykobakterien

Aufgrund der verschiedenen Krankheitserreger lassen sich Mykobakterien in den *M. tuberculosis*-Komplex (MTB-Komplex), *M. leprae* und die nicht-tuberkulösen Mykobakterien (NTM) einteilen. Zum MTB-Komplex zählen neben dem Auslöser der Tuberkulose (*M. tuberculosis*) auch die Erregerstämme von *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. microti* und *M. pinnipedii* [12]. Das *M. tuberculosis* stellt ein obligat aerobes, fakultativ intrazelluläres, unbewegliches, langsam wachsendes Stäbchenbakterium der Familie der Mycobacteriaceae dar [13]. Ihr besonderer Zellwandaufbau mit Lipiden in der äußersten Schicht, gefolgt von einem Mycol-, Arabinogalactan-, Peptidoglycan-Komplex verleiht ihnen ihre Säurefestigkeit und schützt sie zudem vor vielen Antibiotika [14].

2.3 Immunpathogenese einer Infektion mit *M. tuberculosis*

Das *M. tuberculosis* wird meist durch Aerosole oder Feinstaub von infizierten Personen auf andere Menschen übertragen [13]. Die Atemwege stellen somit die Haupteintrittspforte dar, wodurch die Bakterien schnell in tiefere Lungenabschnitte gelangen. Dort werden sie zunächst von Alveolarmakrophagen, dendritischen Zellen und interstitiellen Makrophagen phagozytiert und zu regionären Lymphknoten transportiert [15]. Das Phagosom wird normalerweise angesäuert und verschmilzt mit dem Lysosom zum Phagolysosom. Die im Lysosom enthaltenen Enzyme, Proteine und Peptide können dadurch den Erreger zerstören [11]. Mykobakterien besitzen jedoch die Fähigkeit, die Verschmelzung des Phagosoms mit dem Lysosom zu inhibieren [11, 16]. Zusätzlich können sie die Senkung des pH-Wertes verhindern [17], wodurch die Proteasen des Lysosoms inaktiv bleiben [11]. Allerdings kann die Frage, inwieweit diese Mechanismen für das intrazelluläre Überleben des Bakteriums essenziell sind, noch nicht abschließend beantwortet werden. Zusätzlich zeigen die Mykobakterien eine gewisse Resistenz gegenüber Sauerstoffradikalen durch Lipoarabinomannan, einem Glycolipid der Zellwand [18]. Um den Erreger dennoch zerstören zu können, müssen die Makrophagen durch IFN- γ und ein weiteres Signal, wie beispielsweise eine Liganden-Interaktion aktiviert werden [11]. Die TH1-Zellen erkennen dabei infizierte Makrophagen durch die Peptidpräsentation über MHC-II-Komplexe und exprimieren anschließend den CD40-Liganden, der mit CD40 auf den Makrophagen interagiert und diese dadurch gegenüber IFN- γ sensibilisiert. Zudem werden die TH1-Zellen durch die Interaktion mit den Makrophagen zur IFN- γ Produktion angeregt. Zytotoxische T-Zellen können ebenso Makrophagen aktivieren. Im aktivierten Makrophagen können nun Phagosom und Lysosom besser miteinander verschmelzen, wodurch die Proteasen des Lysosoms freigesetzt werden und ihre abtötende Wirkung entfalten können. Des Weiteren bilden die aktivierten Makrophagen NO und Sauerstoffradikale sowie antimikrobielle Peptide und Proteasen, die die Abtötung der Bakterien zusätzlich unterstützen. Durch die Synthese von IL-12 wird die Umwandlung naiver CD4-

T-Zellen in ihre Effektorzellen aktiviert. Weitere Veränderungen der Makrophagenoberfläche unterstützen die Immunantwort. B7-Moleküle, TNF-Rezeptoren und MHC-Klasse-II-Moleküle werden auf der Oberfläche verstärkt exprimiert, sodass die Zelle einerseits die Peptidfragmente besser den T-Zellen präsentieren kann und deren Entwicklung zu Effektorzellen verstärkt wird. Andererseits reagieren die Makrophagen dadurch selbst empfindlicher auf die Aktivierung. Sie exprimieren zusätzlich TNF- α , der an TNF-Rezeptoren binden kann und zusammen mit IFN- γ eine gute antimikrobielle Wirkung erzielt [11].

Neben der Makrophagenaktivierung spielen die T_H1-Zellen durch ihre Zytokinausschüttung eine besondere Rolle bei der Bekämpfung chronisch intrazellulärer Erreger. Makrophagen, die chronisch mit Bakterien infiziert sind, können diese nicht mehr zerstören. Die durch aktivierte T_H1-Zellen ausgeschütteten Lymphotoxine- (LT) α und der Fas-Ligand können das exprimierte Fas von infizierten Makrophagen erkennen und diese Zellen abtöten [11]. Die Stimulation neuer Makrophagen aus dem Knochenmark wird vor allem durch IL-3 und dem Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierenden-Faktor angeregt, wohingegen TNF- α , LT- α und CXCL2 helfen, neue Makrophagen an den Infektionsherd zu rekrutieren [11].

Es wird angenommen, dass nicht nur die CD4-T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen *M. tuberculosis* spielen, sondern dass ebenso die CD8-T-Zellen für eine effiziente Erregerkontrolle benötigt werden [19-21]. Wie bereits zuvor beschrieben, erkennen CD8-T-Zellen normalerweise Pathogenbestandteile aus dem Zytosol infizierter Zellen über MHC-I-Komplexe. Es werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert, wie es den CD8-T-Zellen trotzdem gelingen kann, Zellen zu identifizieren, die vom *M. tuberculosis* befallen sind. Es wurde festgestellt, dass sich Mykobakterien nicht nur im Phagosom aufhalten, sondern auch im Zytosol zu finden sind [22]. Einerseits wird angenommen, dass die Bakterien das Phagosom aktiv verlassen können, andererseits kann ihnen dies über Mikroschäden in der Wand des Phagosoms gelingen [22, 23]. Wenn Mykobakterien die Makrophagen durch Apoptose zerstören, führt dies zu apoptotischen Vesikeln, die durch dendritische Zellen aufgenommen und über MHC-I-Komplexe an weitere CD8-T-Zellen präsentiert werden können [24]. Neben den klassischen MHC-Komplexen gibt es weitere Moleküle, über die den CD8-T-Zellen Erregerbestandteile des *M. tuberculosis* präsentiert werden können. Dazu zählen Humane-Leukozytenantigen-System- (HLA) E-Moleküle, die unter anderem auf Trophoblasten vorkommen, und CD1-Moleküle, die beispielsweise auf APC exprimiert werden [25]. Eine Kreuzpräsentation von Pathogenen der APC auf CD8-T-Zellen findet ebenso statt, wodurch die Immunantwort der CD8-T-Zellen induziert wird. Die Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- α oder IFN- γ durch CD8-T-Zellen unterstützt, wie bereits oben erwähnt, die Makrophagenaktivierung bei einer Tuberkuloseinfektion [20]. Wenn die Makrophagenaktivierung nicht ausreicht, um alle Mykobakterien zu zerstören, entwickelt sich eine für Tuberkulose typische lokale Gewebsneubildung, ein Granulom. Dabei spielt vor allem das durch Makrophagen und T-Zellen sezernierte TNF- α eine besondere Rolle. Es zeichnet sich dadurch

aus, dass es zu Beginn der Granulombildung die Chemokinexpression und dadurch die Zellrekrutierung verstärkt. Ebenso hilft TNF- α durch die Chemokinausschüttung, die Aufrechterhaltung des Granuloms zu unterstützen [26]. In der Mitte des Granuloms befinden sich Makrophagen mit eingeschlossenen Bakterien, die auch zu Langhans-Riesenzellen verschmelzen können oder durch Lipidakkumulation zu Schaumzellen differenzieren [27, 28]. Außerhalb ordnen sich aktivierte T- und B-Zellen an, wodurch die Erreger eingekreist werden, um deren weitere Ausbreitung einzudämmen [29]. Folglich können die Mykobakterien zwar in den Granulomen persistieren, aber nicht weiter wachsen, was eine LTBI darstellt [30]. Das Granulom wird durch eine fibrotische Kapsel vom umgebenden Gewebe abgetrennt [29]. Studien zufolge stellt das Granulom eine dynamische Struktur dar, bei der Zu- und Abwanderung von Makrophagen und T-Zellen beobachtet werden konnten [28]. Dies bedeutet, dass infizierte Makrophagen das Granulom verlassen können, wodurch die Erreger sich hämatogen ausbreiten können. Ein Sauerstoffmangel und die zytotoxische Wirkung von Makrophagen können zum Absterben der verschiedenen Zelltypen, des Gewebes sowie der Mykobakterien führen, wodurch sich eine verkäsende Nekrose definiert [11]. Die Vorgänge der Nekrose und Apoptose stehen im Verdacht, dem Erreger eine weitere Ausbreitung zu ermöglichen [28]. Die Zerstörung des Granulominneren kann zu dessen Verflüssigung und einer Granulomkavitation führen, wodurch den Erregern ein Zugang zu den Atemwegen geboten wird [31]. Dies wird als offene Tuberkulose bezeichnet, da beim Husten, Niesen oder Spucken eine Tröpfcheninfektion auf andere Menschen stattfinden kann [31].

2.4 Definition latente und aktive Tuberkulose

Als LTBI wird eine Infektion mit *M. tuberculosis* definiert, wenn weder die direkten Nachweisverfahren noch radiologische oder klinische Nachweise eines Organbefundes existieren, aber die indirekten Nachweisverfahren wie der TST und/oder ein IGRA (Kapitel 2.8) positiv ausfallen. Eine aktive Tuberkulose bezeichnet die aktive Erkrankung eines Patienten durch *M. tuberculosis*, die zunächst meist durch unspezifische Symptome wie subfebrile Temperaturen, Appetitminderung, Husten, Nachtschweiß und Hämoptoe gekennzeichnet ist [32]. Eine Erstinfektion (Primärtuberkulose) kann sich als LTBI oder aktive Tuberkulose darstellen. Bei den aktiven Tuberkulosen werden verschiedene Formen unterschieden. Eine manifeste Primärtuberkulose zeichnet sich dabei durch radiologische Veränderungen aus. Diese können sich zum einen als ein intrapulmonaler spezifischer Tuberkuloseherd (Ghon-Herd/Primäraffekt) darstellen, der im Zusammenhang mit einer lokalen Lymphknotenreaktion als Primärkomplex bezeichnet wird [13]. Zum anderen können sich kleine Organherde, sogenannte *minimal lesions*, zeigen, welche durch hämatogene Streuung bei der Primärinfektion entstehen können. In seltenen Fällen kann die Primärtuberkulose auch als Hiluslymphknoten-Tuberkulose, Pleuritis- oder Meningitis-Tuberkulose oder Miliartuberkulose in Erscheinung treten. Als postprimäre Tuberkulose oder Zweitinfektion wird eine Organinfektion nach einer zurückliegenden Erstinfektion bezeichnet, die zu 80 % die Lunge und zu 20 % extrapulmonale Organe betrifft. Diese Form der aktiven Tuberkulose entsteht durch eine endogene Reaktivierung alter Organherde oder seltener durch eine exogene

Reinfektion einer bereits infizierten Person. Bei einer Aussaat der Erreger kann die extrapulmonale Tuberkulose jedes Organ befallen, wie beispielsweise den Urogenitaltrakt oder die Haut [32]. In den meisten Fällen verläuft eine Infektion latent ab, nur ca. 5-10 % der infizierten Patienten erkranken in ihrem Leben an einer aktiven Tuberkulose [33].

2.5 Medikamentöse Prävention und Therapie der Tuberkulose

Um den Ausbruch einer aktiven Tuberkulose vermeiden zu können, sollen laut WHO alle Haushaltskontakte von Personen mit bakteriologisch nachgewiesener aktiver Tuberkulose, Personen die mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) infiziert sind, Kinder unter fünf Jahren und Risikopersonen nach Ausschluss einer aktiven Tuberkulose eine Chemoprophylaxe erhalten. Zusätzlich sollen Kontaktpersonen von aTB mit nachgewiesener LTBI nach Durchführung eines TSTs oder IGRAs eine präventive Therapie durchführen [34]. Diese kann entweder aus einer mindestens sechsmonatigen täglichen Therapie mit Isoniazid (INH) sowie alternativ einer wöchentlichen Gabe von Rifampin und INH für drei Monate oder der täglichen Gabe dieser Kombination für einen Monat, einer täglichen Dosis von Rifampicin und INH für drei Monate oder einer täglichen Dosis Rifampicin für vier Monate bestehen [7]. Eine weitere Maßnahme zur Prävention einer Tuberkulose stellt die Impfung dar. Bei der weltweit am häufigsten angewandten BCG-Impfung handelt es sich um einen attenuierten Lebendimpfstoff, der aus *M. bovis*-Stämmen isoliert wird [32]. Seit 1998 wird das Vakzin in Deutschland nicht mehr von der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert-Koch-Institut empfohlen. Dadurch folgt die STIKO den Empfehlungen der WHO. Diese rät in Ländern mit einem Infektionsrisiko für Tuberkulose unter 0,1 %, wie beispielsweise Deutschland, auf die Impfung aufgrund des geringen Ansteckungsrisikos, aber der gleichzeitig bestehenden Impfrisiken zu verzichten [35]. Des Weiteren schützt das Vakzin ältere Kinder und Erwachsene nur bedingt [36]. Bei Säuglingen konnte eine Wirksamkeit von ca. 70 % nachgewiesen werden [37]. Verschiedene neue Impfstoffe sind Gegenstand aktueller Forschungen. Die bisher an Probanden getesteten Kandidaten kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Der H4IC31 Impfstoff zeigt in Bezug auf eine QuantiFERON-Konversion eine Wirkung von 30,5 % im Vergleich zur BCG-Auffrischimpfung, die eine Wirksamkeit von 45,4 % aufweist [38]. Das Vakzin M72/AS01_E hingegen induziert eine verstärkte Immunantwort und zeigt nach einem Beobachtungszeitraum von drei Jahren eine Effektivität von 49,7 % zur Verhinderung der Progression einer LTBI in eine aktive Tuberkulose [39]. Weitere Forschungsansätze und Langzeitstudien hinsichtlich der Vakzine müssen erfolgen, um eine suffiziente Prävention gewährleisten zu können.

Die Behandlung der aktiven Tuberkulose stellt sich aufgrund verschiedener Faktoren langwierig und schwierig dar. Einerseits erschwert der Aufbau der bakteriellen Zellwand die Wirkung der Therapie mit Antibiotika, andererseits haben sich seit Beginn der Verwendung von Antibiotika viele multiresistente Stämme entwickelt. Patienten mit aktiver Tuberkulose, ohne Resistenzen und ohne Komorbiditäten werden in der Intensivphase zunächst zwei Monate mit INH, Rifampicin, Ethambutol und Pyrazinamid

behandelt. In der Fortsetzungsphase müssen sie für vier weitere Monate INH und Rifampicin einnehmen. Neue Empfehlungen wie beispielsweise die Kombination aus einer zweimonatlichen Gabe von INH, Rifapentin, Moxifloxacin und Pyrazinamid, gefolgt von einer erneuten zweimonatlichen Gabe dieser Arzneimittel jedoch ohne Pyrazinamid, sollen durch verkürzte Behandlungszeiträume die *Compliance* der Erkrankten und damit einhergehend das *Outcome* verbessern [40]. Schwieriger wird die Therapie bei Personen, die an einer multiresistenten Tuberkulose (MDR-TB) leiden. Hierbei weisen die Erreger Resistenzen gegen INH und Rifampicin auf. Bei einer zusätzlichen Resistenz gegen Fluorchinolone handelt es sich um eine prä-extrem arzneimittelresistente Tuberkulose (prä-XDR). Ebenso sind die therapeutischen Möglichkeiten bei Patienten mit XDR-TB, die sich durch Resistenzen gegen INH, Rifampicin, Fluorchinolone und Bedaquilin oder Linezolid definiert, limitiert [7]. Insgesamt müssen aufgrund der komplexen und nebenwirkungsreichen Behandlung individuelle Antibiotikaregime erstellt werden, die von spezialisierten Zentren durchgeführt werden sollten.

2.6 Personen mit erhöhtem Tuberkuloserisiko

Allgemein betrachtet, steigt das Risiko, an einer aktiven Tuberkulose zu erkranken und das Risiko der endogenen Reaktivierung durch eine Immundefizienz an [41, 42]. Eine Immunsuppression kann zum Beispiel iatrogen oder bei terminaler Niereninsuffizienz [43], bei einer Infektion mit HIV [44, 45], Mangelernährung [46], Alkohol- [47] sowie Drogenabhängigkeit [48], Tumorerkrankungen, Transplantationen [49, 50], Silikose [51] oder Diabetes mellitus [52] entstehen. In dieser Arbeit wurde der QuantiFERON-TB Gold Plus Test in verschiedenen immunsupprimierten Patientengruppen durchgeführt. Im Folgenden werden die Risikofaktoren zur Schwächung des Immunsystems dieser Probanden näher erläutert.

2.6.1 Patienten mit chronischer Nierenerkrankung und Dialysebehandlung

Verschiedene Studien zeigen, dass Patienten, die aufgrund einer chronischen Nierenerkrankung eine Dialysebehandlung benötigen, häufiger an Tuberkulose erkranken als die Normalbevölkerung [53-55]. Dies begründet sich zum einen dadurch, dass die T-Zellaktivierung bei Dialysepatienten/*chronic renal failure* (CRF) vermindert ist, da die costimulierenden Funktionen von APC eingeschränkt sind [56]. Zudem führt die Dialyse zu einer inflammatorischen Aktivierung des Immunsystems, die durch eine Überproduktion von IL-6 gekennzeichnet ist, wodurch die Aktivierung von Effektorzellen zusätzlich verringert wird [57]. Des Weiteren tragen die Begleiterscheinungen einer Nierenerkrankung wie beispielsweise ein Vitamin-D-Mangel zu einem erhöhten Aufkommen an Tuberkulose von CRF bei [58]. Insbesondere in den ersten Jahren der Dialysebehandlung scheint das Risiko für die Tuberkuloseentwicklung am höchsten zu sein [53, 55].

2.6.2 Patienten nach Nierentransplantation

Um eine Abstoßung zu vermeiden, müssen Patienten, die eine Nierentransplantation erhalten, verschiedene Kombinationen aus Immunsuppressiva einnehmen. Diese beeinflussen auf unterschiedliche Art und Weise das Immunsystem des Empfängers, wodurch das Risiko einer Transplantatabstoßung minimiert wird, jedoch die Abwehr gegen Krankheitserreger, wie zum Beispiel gegen *M. tuberculosis*, geschwächt abläuft. Eine mögliche immunsupprimierende Medikamentengruppe nach einer Nierentransplantation stellen die Glucocorticoide dar. Sie binden an membrangebundene und intrazelluläre Rezeptoren der Steroidrezeptorsuperfamilie. Durch die gebundenen Steroide kann der Steroid-Rezeptor-Komplex die Kernmembran passieren, sich an genregulatorische Sequenzen der Desoxyribonucleinsäure (DNA) heften und dort die Transkription verschiedener Gene beeinflussen. Ebenso kann durch die Interaktion mit *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* die Transkription dieser Gene verhindert werden. Diese Vorgänge führen zu verschiedenen Effekten wie zum Beispiel einer verminderten Produktion von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen, wodurch weniger Immunzellen zum Infektionsherd gelangen können. Außerdem führen Leukozyten und Lymphozyten verstärkt eine Apoptose durch. Durch die zusätzlich geminderte Proliferation kommt es oft zu einer Lymphozytopenie, die auch durch die Umverteilung der Lymphozyten aus dem Blut in andere Bereiche des Körpers erklärt werden kann [11, 59]. Des Weiteren inhibieren Glucocorticoide viele Funktionen der Makrophagen [60]. Dies erklärt, warum Patienten, welche mit dieser Medikamentengruppe behandelt werden, ein erhöhtes Risiko der Tuberkuloseentwicklung haben [61]. Zusätzlich werden zur Immunsuppression nach Transplantation Calcineurininhibitoren eingesetzt. Aktiviertes Calcineurin führt zur Dephosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor of activated T-cells*, der die Transkription von Genen fördert, die für die Bildung von beispielsweise IL-2, TNF- α , IL-3, IL-4, CD40-Ligand und dem Fas-Liganden benötigt werden. Da IL-2 das Wachstum von T-Zellen beeinflusst, werden bei der Verwendung von Calcineurininhibitoren die Aktivierung und die klonale Expansion der T-Zellen gehemmt [62]. Die Wirkstoffgruppe der *mammalian (mechanistic) target of rapamycin* (mTOR) Inhibitoren wird aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkung ebenso nach Nierentransplantationen eingesetzt. Sirolimus stellt dabei eine der Leitsubstanzen dar. Seine Interaktion mit mTOR führt zur Inhibition der IL-2 gesteuerten Signaltransduktion, wodurch der Zellzyklus der T-Lymphozyten gehemmt wird [63]. Ein anderes Medikament, das postoperativ nach der Transplantation genutzt werden kann, stellt der IL-2-Rezeptor-Antagonist Basiliximab dar. Dieser chimäre Antikörper interagiert mit dem IL-2-Rezeptor und inhibiert dessen weitere Signalkaskade. Dadurch werden die Differenzierung und die Proliferation von T-Zellen verhindert [64]. Die Gruppe der Antimetabolite wird unter anderem durch Mycophenolatmofetil repräsentiert. Die aktive Form Mycophenolsäure inhibiert Inosinmonophosphat-Dehydrogenase, welches als Enzym für die Synthese der Guanosin-Nukleotide verantwortlich ist, was sich in erster Linie auf die DNA-Synthese auswirkt. Dadurch wird hauptsächlich die Proliferation von B- und T-Zellen

gestoppt, da sie im Gegensatz zu den meisten anderen Zellen auf den Inosin-Monophosphat-Weg angewiesen sind [11, 64]. Bei einer Nierentransplantation werden ebenso wie bei einer Stammzelltransplantation Antikörper verwendet, die gezielt Lymphozyten angreifen und eine Lymphozytopenie verursachen. Dabei unterscheiden sich die depletierenden Antikörper, die die Lymphozyten zerstören, von den nicht depletierenden Antikörpern, die nur die Funktion ihrer Zielzelle verhindern, ohne diese abzutöten [11]. Da diese verschiedenen Substanzklassen kombiniert eingenommen werden und auf vielfältige Art und Weise das Immunsystem schwächen, erklärt dies unter anderem, wieso nierentransplantierte Patienten ein erhöhtes Risiko für eine Tuberkuloseinfektion aufweisen [65]. Dieses ist aufgrund der Stärke der Immunsuppression vor allem im ersten Jahr nach der Transplantation am höchsten [66]. Deshalb sollten Patienten vor einer möglichen Transplantation auf eine LTBI gescreent werden. Bei einem positiven IGRA oder TST muss eine individuelle Risikostratifizierung hinsichtlich einer möglichen präventiven Therapie, wie in Kapitel 2.5 beschrieben, erfolgen [67, 68].

2.6.3 Patienten nach Stammzelltransplantation

Stammzelltransplantationen stellen eine kurative Behandlungsmöglichkeit bei verschiedenen malignen Erkrankungen wie unter anderem Leukämien, Lymphomen und dem multiplen Myelom dar [32]. Weitere Anwendungsgebiete finden sich beispielsweise bei der aplastischen Anämie oder der homozygoten Sichelzellanämie [32]. Um eine Abstoßungsreaktion der neuen Stammzellen zu vermeiden, muss vor einer Transplantation zunächst eine Konditionierung des Immunsystems des Empfängers stattfinden. Verschiedene Medikamente werden dafür verwendet, wovon die Glucocorticoide, die Calcineurininhibitoren und die Antikörper bereits im Abschnitt 2.6.2 beschrieben wurden. Ebenso erhalten die Patienten im Vorfeld einer Stammzelltransplantation eine Chemotherapie oder Radiatio, gegebenenfalls auch eine Kombination aus beidem, die der Konditionierung dienen und je nach Grunderkrankung, Komorbiditäten und anderen individuellen Faktoren, unterschiedlich ausfallen [69]. Trotz dieser starken Immunsuppression zeigt sich in verschiedenen Studien für autologe Transplantationen das gleiche Risiko zur Entwicklung einer Tuberkulose sowie ein nur leicht erhöhtes Risiko für allogene Transplantationen im Vergleich zur jeweiligen landesspezifischen gesunden Bevölkerung [70-72]. Erklären lässt sich dies einerseits dadurch, dass Stammzelltransplantationen vor allem in Ländern durchgeführt werden, in denen eine allgemein niedrige Tuberkuloserate vorliegt und dass andererseits die Dauer der starken Immunsuppression bei diesen Patienten zeitlich begrenzt ist [73].

2.6.4 Patienten mit rheumatischen Erkrankungen

Für Patienten, die an Erkrankungen des rheumatoiden Formenkreises leiden (RA), insbesondere für jene mit rheumatoider Arthritis, besteht ein erhöhtes Risiko einer Tuberkuloseentwicklung im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung [74-76]. Diese Patienten leiden aufgrund von Autoimmunreaktionen wie autoreaktiven B- und T-Zellen häufig an Polyarthritiden, Bursitis, Tendovaginitis und unspezifischen

Allgemeinsymptomen [32]. Um dem Autoimmunprozess, der die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, Autoantikörpern und Entzündungsmediatoren vorantreibt, entgegenzuwirken, werden die Patienten mit verschiedenen immunmodulatorisch wirkenden Medikamenten behandelt. Neben den bekannten Glucocorticoiden werden zur Therapie heutzutage zusätzlich *Disease Modifying Antirheumatic Drugs* (DMARDs) und *Biologicals* verwendet, wodurch das Immunsystem der Patienten eine iatrogene Schwächung erfährt [32]. Zu den *Biologicals* zählen unter anderem die TNF- α -Antikörper Infliximab, Adalimumab, Certolizumab, Golimumab, sowie das Fusionsmolekül Etanercept [32]. Wie zuvor bereits beschrieben, spielt TNF- α eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung der Tuberkuloseinfektion. Dadurch wird deutlich, weshalb die Gabe von *Biologicals* zu einem erhöhten Reaktivierungsrisiko einer LTBI führt [75, 77, 78]. Beim Vergleich der Präparate untereinander fällt auf, dass für Infliximab und Adalimumab die Inzidenz der Entwicklung einer aktiven Tuberkulose höher ist als bei Etanercept [77, 79]. Ebenso stehen die DMARDs im Verdacht, die Ausbreitung der Tuberkulose zu fördern [80, 81]. Aufgrund dieser Beobachtung sollte gemäß den aktuellen Leitlinien der Ausschluss einer Infektion mit *M. tuberculosis* vor jedem Therapiebeginn mit TNF- α -Inhibitoren erfolgen [82, 83].

2.7 Diagnostik der aktiven Tuberkulose

Zur Diagnostik einer Tuberkulose werden verschiedene Instrumente eingesetzt. Neben der Anamnese und den klinischen Symptomen können unter anderem hiläre Lymphknotenvergrößerungen, Kavernen und fleckförmige Verschattungen auf Röntgenaufnahmen Hinweise für eine aktive Tuberkulose liefern. Diese sind allerdings nicht spezifisch für Tuberkulose, sondern können auch auf verschiedene andere Pathologien wie Tumore, Abszesse oder Zysten hindeuten. Um die Diagnose durch den direkten Erregernachweis sicherstellen zu können, sollten Körperflüssigkeiten wie Sputumproben oder durch Bronchoskopie beziehungsweise bronchoalveoläre Lavage gewonnene Bronchialsekrete kultiviert werden. Die Möglichkeit der Resistenztestung stellt bei der Kultur einen großen Vorteil dar [83]. Der Nachteil dieses als Goldstandard definierten Verfahrens besteht darin, dass die Anzucht aufgrund des langsamen Wachstums der Mykobakterien auf Festmedien ungefähr vier Wochen und auf einer Flüssigkultur mindestens zwei Wochen dauert [32]. Die Mikroskopie wird als zweiter Pfeiler des direkten Erregernachweises genutzt. Aufgrund der Säurefestigkeit der Mykobakterien müssen spezielle Färbemethoden verwendet werden, wobei die Ziehl-Neelsen-, die Kinyoun- sowie die Fluoreszenzfärbung zur Verfügung stehen [84]. Allerdings sind diese Färbungen nicht spezifisch für *M. tuberculosis*, sodass auch andere säurefeste Stäbchenbakterien wie NTM angefärbt werden. Ebenso kann sich aus verdächtigem Gewebe Biopsien entnehmen lassen, die anschließend histologisch untersucht werden [83]. Aufgrund der Invasivität des Eingriffs stellt dies jedoch keine Routinemaßnahme dar.

Eine weitere Nachweismethode bietet der Nukleinsäureamplifikationstest (NAT). Dieser kann über Nukleinsäuresequenzen mykobakterielle DNA sowie Genmutationen nachweisen. Die Sensitivität

übersteigt die der Mikroskopie, unterliegt allerdings der Kultur, weshalb diese weiterhin als Goldstandard zählt [85, 86]. Eine neue Generation des NAT stellt der von der WHO empfohlene Xpert MTB/RIF Ultra dar, der Rifampicin-Resistenzen erkennen kann [87, 88]. Die direkten Nachweisverfahren spielen vor allem für die Diagnostik einer aktiven Tuberkulose eine Rolle, wohingegen indirekte Methoden für den Nachweis einer LTBI benötigt werden, da sich bei dieser Infektion per definitionem kein Erreger nachweisen lässt.

2.8 Diagnostik der LTBI

2.8.1 Indirekte Nachweismethoden

Bei indirekten Nachweisverfahren wird nicht der Erreger selbst nachgewiesen, sondern es lassen sich nur indirekt die verschiedenen Antworten des Immunsystems auf den Keim darstellen. Dies zeigt sich beispielsweise durch eine erhöhte Expression von Zytokinen wie IFN- γ nach Stimulation von T-Zellen, die spezifisch für *M. tuberculosis* sind. Des Weiteren kann die Hautreaktion auf ein Antigen als indirekte Nachweismethode eingestuft werden. Durch die kommerziell verfügbaren indirekten Verfahren kann die Diagnose einer aktiven Tuberkulose bisher nicht gestellt werden, da diese Tests keine Differenzierung zu einer LTBI zulassen. Vielversprechende Ansätze zur Unterscheidung einer aktiven Tuberkulose von einer LTBI liefern beispielsweise Untersuchungen, die das Zytokinprofil der reaktiven T-Zellen der Menschen miteinander vergleichen [89]. Um eine sichere Differenzierung treffen zu können, müssen die diagnostischen Verfahren weiterentwickelt werden [90].

2.8.1.1 Tuberkulinhauttest

Der TST kann zur *in vivo* Diagnostik einer LTBI verwendet werden. Dieser wird vor allem nach Mendel-Mantoux durchgeführt, wobei eine definierte Menge Tuberkulin intrakutan in den Unterarm injiziert und die Hautreaktion des Körpers erfasst wird. In Deutschland wird das PPD RT 23 SSI des *Statens Serum Institut* (SSI) Kopenhagen seit August 2005 als Tuberkulin benutzt [12]. PPD steht für *purified protein derivate* und ist ein Proteingemisch aus über 200 verschiedenen mykobakteriellen Antigenen [91], die teilweise auch in BCG-Impfstämmen und NTM vorkommen, wodurch sich die Kreuzreaktionen der unterschiedlichen Erregerstämme erklären lassen [92]. 48-72 Stunden nach der Injektion von Tuberkulin kann der Durchmesser der entstandenen Induration in Millimetern gemessen werden. Diese entsteht aufgrund einer spezifischen Immunreaktion vom verzögerten hypersensitiven Typ. Durch das Tuberkulin kommt es bei einer bestehenden zellulären Immunität gegen Komponenten des Tuberkulins zu einer spezifischen T-Zell-abhängigen Zytokinausschüttung, die zu einer lokalen Entzündungsreaktion führt [93]. Durch die erhöhte Permeabilität der Blutgefäße entsteht eine verhärtete Schwellung an der Einstichstelle, deren Durchmesser für die Interpretation entscheidend ist [11, 83]. Allgemein wird die Induration je nach Größe einem von drei Grenzwerten zugeteilt: 5 mm, 10 mm, 15 mm. Die Auswertung hängt mit dem persönlichen Risiko des Patienten zusammen. Beispielsweise

gelten bei Immunsupprimierten und Patienten, die in engem Kontakt zu einer Person mit einer offenen Tuberkulose standen, bereits Werte ab 5 mm als positiv. Durch andere Risikofaktoren wie das Leben in einem Land mit hoher Tuberkuloserate verschiebt sich der *Cut-off*-Wert auf ≥ 10 mm. Bei gesunden Probanden wird ein Wert ≥ 15 mm als LTBI gewertet [83]. Wie bereits zuvor erwähnt, kann die Kreuzreaktivität zu falsch-positiven Befunden führen, wenn der Patient mit NTM infiziert ist oder er eine BCG-Impfung erhalten hat. Die Beeinflussung des TST durch das Vakzin hängt hauptsächlich davon ab, in welchem Alter die Person geimpft wurde und wie lange die Immunisierung zurück liegt. Eine Impfung im Säuglingsalter beeinflusst den TST nach zehn Jahren nur noch geringfügig, wohingegen Impfungen, die im Kindesalter oder später appliziert wurden, längerfristig falsch-positive Testergebnisse hervorrufen können [94, 95]. Falsch-negative Befunde können vor allem bei immunsupprimierten Menschen wie beispielsweise Nierentransplantierten oder HIV-Patienten sowie bei Kleinkindern auftreten [96-98]. Die falsche Anwendung und Auswertung des Tests kann ebenso zu falsch-negativen Ergebnissen führen, weshalb der TST nur durch geschultes Personal durchgeführt werden sollte.

2.8.2 *In vitro* Diagnostik

Neben dem *in vivo* Verfahren wurden auch Screeningtests zur *in vitro* Diagnostik entwickelt. Dabei lassen sich die bei der *in vivo* Diagnostik genannten Kreuzreaktionen umgehen, indem Antigene verwendet werden, die spezifisch für den MTB-Komplex sind. Die beiden Antigene *early secretory antigenic target 6* (ESAT-6) und *culture filtrate protein 10* (CFP-10), die auf der *region of difference 1* (RD-1 Region) des *M. tuberculosis* Genoms kodiert werden, spielen dabei die wichtigste Rolle. Die *M. bovis*-BCG-Impfstämme und NTM, außer *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. flavescens* und *M. szulgai*, weisen in dieser Region eine Deletion auf [99]. *T-cell*-IGRAs stellen *in vitro* Bluttests dar, die die Antigene ESAT-6 und CFP-10 nutzen, um die IFN- γ -Antwort von T-Zellen zu stimulieren, wodurch sie Rückschlüsse über eine zellvermittelte Immunantwort gegen *M. tuberculosis* zulassen [100]. Aufgrund der fehlenden Kreuzreaktionen mit BCG-Impfstämmen und NTM weisen IGRAs eine höhere Spezifität als der TST auf [101-103]. Die in den vergangenen Jahren hauptsächlich verwendeten IGRAs waren der T-SPOT.TB Test der Firma Oxford Immunotec und der QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test der Firma Cellestis/Qiagen. Das Prinzip des T-SPOT.TB Test beruht auf der Detektion der Anzahl der IFN- γ -produzierenden T-Zellen durch die *Enzyme-Linked Immunospot Assay* Methode (ELISPOT). Dabei werden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) mit den Antigenen ESAT-6 und CFP-10 auf einer Platte, die mit Antikörpern gegen IFN- γ beschichtet ist, inkubiert. Die durch die Antigene spezifisch stimulierten T-Zellen setzen IFN- γ frei, das an die Antikörper der Mikrotiterplatte bindet. Durch die Zugabe eines zweiten Antikörpers, der mit einem Enzym gekoppelt ist, das bei Substratzusatz einen Farbumschlag bewirkt, entstehen farbige Spots. Diese repräsentieren die reaktiven T-Zellen, die IFN- γ produziert haben und müssen für die Auswertung ausgezählt werden [104]. Beim QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test wird die IFN- γ -Konzentration (IU/ml) im Plasma durch *Enzyme-Linked*

Immunosorbant Assay (ELISA) nachgewiesen. Dabei wird heparinisierendes Vollblut eines Patienten in ein Röhrchen gefüllt, das mit den Antigenen der RD-1 Region ESAT-6 und CFP-10 sowie dem auf der RD-11 Region lokalisierten Antigen TB-7.7 beschichtet ist. Dies führt in der sich anschließenden Inkubationszeit zur IFN- γ -Produktion durch spezifisch stimulierte T-Zellen. Danach wird das Plasma auf eine ELISA-Platte pipettiert, deren Boden mit Antikörpern gegen IFN- γ beschichtet ist. Das gebundene IFN- γ wird nun durch einen zweiten enzymmarkierten Antikörper nachgewiesen. Durch Zugabe eines geeigneten Substrates führt das Enzym zu einem Farbumschlag. Nach dem Messen der optischen Dichte dient entweder eine durch den Hersteller entwickelte Analysesoftware oder eine Standardkurve der Berechnung der quantitativen IFN- γ -Konzentration [105].

Aufgrund eines fehlenden Goldstandards für den Nachweis einer LTBI und unterschiedlichen Studienergebnissen bezüglich der Spezifität und Sensitivität von TSTs und IGRAs gibt es verschiedene Empfehlungen für die Diagnostik einer LTBI. Eine Metaanalyse von 2008 fand heraus, dass der QuantiFERON-TB Gold Test eine Sensitivität von durchschnittlich 78 % aufweist und der T-SPOT.TB eine von 90 %. Die Spezifität betrug 99 % bei nicht geimpften und 96 % bei geimpften Probanden für den QuantiFERON-TB Gold Test, beim T-SPOT.TB 93 % und für den TST bei nicht geimpften 97 %, wohingegen bei geimpften Personen keine einheitliche Aussage aufgrund der erheblichen Streuung in den einzelnen Studien getätigt werden konnte [106]. Bei einer Metaanalyse von 2011 lag die gepoolte Spezifität, die dem arithmetischen Mittel der Einzelstudien entspricht, für den QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test bei 100 % und für den T-SPOT.TB bei 98 %, wohingegen die gepoolte Spezifität für den TST bei 88,7 % lag [107]. Die *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) empfehlen beispielsweise die IGRAs gegenüber den TSTs bei Personen, die ein geringes bis mittleres Risiko haben, aus einer LTBI eine aktive Tuberkulose zu entwickeln. Bei einem hohen Risiko fehlen den CDC eindeutige Daten, um einen Test klar bevorzugen zu können [83]. Bei HIV-Patienten scheint die Sensitivität der IGRAs gegenüber immungesunden Personen, ähnlich wie die der TSTs, abzunehmen, weshalb eine Alternative für die sichere Testung dieser Personengruppen benötigt wird [108]. Problematisch bleibt zusätzlich, dass durch keinen dieser Tests eine verlässliche Differenzierung zwischen einer aktiven und latenten Tuberkulose möglich ist [90, 109]. Um dieses Problem zu lösen, werden dringend neue Screeningverfahren benötigt.

2.8.3 Alternative Screeningverfahren

2.8.3.1 C-TB-Test

Die *M. tuberculosis* spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10 werden in einem neuen Hauttest, dem C-TB-Test, der vom SSI entwickelt wurde, anstelle von PPD verwendet. Die bereits erwähnte Mantoux-Technik wird auch bei diesem Test angewandt. Ersten Studien zufolge besteht bei diesem Verfahren keine Kreuzreaktion mit BCG-Impfstämmen, wodurch die Spezifität im Vergleich zum TST erhöht ist [110, 111]. Allerdings konnte bei aTB eine niedrigere Sensitivität (73,9 %) im Vergleich zum

TST (89 %) festgestellt werden [112]. Es bleibt daher abzuwarten, ob sich der neue gegen den alten Screeningtest durchsetzen kann.

2.8.3.2 QuantiFERON-TB Gold Plus

Eine neue Generation des QuantiFERON Tests, der QuantiFERON-TB Gold Plus, wurde von der Firma Qiagen entwickelt. In diesem Test werden im TB-1-Röhrchen nur noch die Antigene ESAT-6 und CFP-10 und nicht mehr TB7.7 genutzt. Die Innovation besteht jedoch in einem weiteren Röhrchen, dem TB-2-Röhrchen, das eine zusätzliche Kombination aus kürzeren CFP-10 Peptiden enthält, die vor allem die zytotoxischen CD8-T-Zellen anregen sollen. Dies könnte insbesondere für Menschen mit geringer CD4-T-Zellzahl von Vorteil sein, da die Sensitivität bei den aktuellen Tests bei diesen Patienten vermindert ist. Durch das Ansprechen von CD8-T-Zellen sollte die Sensitivität in diesen Fällen gesteigert werden. Ein weiterer Vorzug dieses Tests könnte die Differenzierung zwischen einer LTBI und einer aktiven Tuberkulose darstellen. Es wird postuliert, dass vor allem bei aktiven Tuberkulosen die CD8-T-Zellen eine wichtige Rolle spielen und vermehrt für die Immunantwort verantwortlich sind [113]. Die Differenz aus dem TB-2- und dem TB-1-Röhrchen soll die CD8-T-Zellantwort darstellen und könnte daher ein Surrogatmarker für die Wahrscheinlichkeit der Progression von einer LTBI zu einer aktiven Tuberkulose werden [114].

2.8.3.3 Durchflusszytometrie

Ein nicht routinemäßig durchgeführtes Verfahren zur Tuberkulosedagnostik stellt die Durchflusszytometrie mittels *fluorescence-activated-cell-sorter* (FACS) dar. Hierbei wird Vollblut mit verschiedenen Antigenen des MTB-Komplexes stimuliert. Durch die Zugabe eines Sekretionsinhibitors akkumulieren die Zytokine in den Zellen, die sie exprimiert haben. Anschließend erfolgt die Fixierung der Zellen. Um es fluorochromgekoppelten Antikörpern zu ermöglichen, nicht nur an die Oberflächenrezeptoren der einzelnen Zellen, sondern auch an die intrazellulären Zytokine zu binden, erfolgt die Permeabilisierung der Zellmembran durch das Hinzufügen geeigneter Substanzen. Anschließend führt man die Zellen einzeln an einem Laser vorbei, der die fluorochromgekoppelten Antikörper anregt. Dieser Vorgang ermöglicht es, quantitative und qualitative Aussagen über die Zelle selbst und über ihre Zytokinexpression zu treffen [115]. Dies lässt sich in einem Dotplot-Diagramm darstellen. Eine detaillierte Beschreibung erfolgt im Abschnitt 3 Material und Methoden.

2.9 Ziele der Arbeit

Der neue QuantiFERON-TB Gold Plus Test stellt ein weiterentwickeltes Testverfahren zur Tuberkulosedagnostik dar. Unter Verwendung eines neuen TB-2-Röhrchens sollen vermehrt CD8-T-Zellen zur IFN- γ -Produktion beitragen. Die Evaluierung dieses Tests wurde bisher nur an kleinen Probandengruppen durchgeführt und die reagierenden Zellen wurden dabei selten hinsichtlich ihres Ursprungs untersucht. Die vorliegende Arbeit dient der weiteren Analyse des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests und legt ein besonderes Augenmerk auf immunsupprimierte Patienten. Insbesondere soll dabei die Möglichkeit der Anwendung des neuen Diagnostikums bei immundefizienten Menschen untersucht werden. Zusätzlich sollen mithilfe der Durchflusszytometrie die reagierenden T-Zellen im QuantiFERON-TB Gold Plus Test quantitativ und qualitativ analysiert werden und dabei die Unterschiede der reagierenden Zellen auch hinsichtlich ihrer exprimierten Zytokine zwischen immunsupprimierten und gesunden Probanden festgestellt werden. Nach zwei Jahren erfolgte ein *Follow-up*, um die Progressionsrate der LTBI zu einer aktiven Tuberkuloseerkrankung zu bestimmen und diese mit der Differenz der beiden Röhrchen zu vergleichen.

Die folgenden Hypothesen wurden untersucht:

- Der neue QuantiFERON-TB Gold Plus Test besitzt eine höhere Spezifität als der QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test. Immungesunde Personen und Patienten ohne Risikofaktoren dienen als Spezifitätskontrolle.
- Die Sensitivität des QuantiFERON-TB Gold Plus Test unterscheidet sich nicht bei immungesunden Personen und immungeschwächten Patienten. Die Sensitivität wird durch die Analyse des prozentualen Anteils positiver Testergebnisse immungesunder Personen und immungeschwächter Patienten mit aktiver Tuberkulose ermittelt.
- Bei immungeschwächten Patienten hat der QuantiFERON-TB Gold Plus Test einen geringeren Anteil unschlüssiger Ergebnisse im Vergleich zum QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test.
- Der positiv prädiktive Wert zur Vorhersage einer aktiven Tuberkulose erhöht sich durch Anwendung des neuen Testverfahrens.
- Positive Testergebnisse im QuantiFERON-TB Gold Plus Test zeigen eine Assoziation mit Risikofaktoren einer Exposition mit *M. tuberculosis*.
- Die reagierenden Zellen der immunsupprimierten Personen und der Kontrollen unterscheiden sich nicht.
- Im TB-2-Röhrchen des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests reagieren vor allem CD8-positive-T-Zellen.

3 Material und Methoden

3.1 Probandenpopulation

Um den QuantiFERON-TB Gold Plus Test in verschiedenen Probandengruppen zu evaluieren, erfolgte die Rekrutierung von 448 Personen. Diese wurden in die Gruppen Kontrollen, solide organtransplantierte Patienten (SOTR), CRF, stammzelltransplantierte Patienten (SCTR), RA und aTB unterteilt. Alle Probanden wurden über die Studie und die damit zusammenhängende Blutentnahme sowie das *Follow-up* aufgeklärt und erteilten ihre schriftliche Zustimmung. Nach der Blutentnahme von 4,7 ml Lithium-Heparin, die zur Durchführung des Testes notwendig waren, und einem 2,7 ml-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Röhrchen zur Erstellung eines Differenzialblutbildes, erfolgte zusätzlich die Risikostratifizierung anhand eines Fragebogens. Ein Ethikvotum der Ärztekammer des Saarlandes liegt vor (Aktenzeichen 134/15, 221/15, 26/08).

Zur Gruppe der 81 CRF wurden Menschen gezählt, die an terminaler Niereninsuffizienz litten und daher regelmäßig eine Hämodialyse bekamen. Die 85 SOTR erhielten alle mindestens einmal in ihrem Leben eine Transplantation eines soliden Organs. Der Funktionsverlust dieses Organs zum Untersuchungszeitpunkt galt als Ausschlusskriterium. Es wurden 79 Patienten nach einer oder mehreren Nierentransplantationen herangezogen, sowie einer mit einer kombinierten Nieren- und Pankreastransplantation. Bei zwei Personen lag eine Lungen- und Nierentransplantation vor sowie bei drei eine Lebertransplantation. Zu den Einschlusskriterien der 89 SCTR zählte, dass die Personen entweder eine oder mehrere autologe (34 Personen) oder allogene Stammzelltransplantationen (50 Probanden) erhielten oder eine Kombination aus den vorher genannten Transplantationsformen (fünf Personen). In die Gruppe der 98 RA wurden Menschen eingeschlossen, die an einer Erkrankung des rheumatischen Formenkreises leiden und regelmäßig in der rheumatologischen Abteilung des Universitätsklinikums des Saarlandes vorstellig wurden. Dabei machten die rheumatoide Arthritis (37 Personen), die Psoriasisarthritis (16 Personen) sowie der systemische Lupus erythematodes (15 Patienten) den überwiegenden Anteil der rheumatischen Krankheiten aus. Von den aTB wurde nur einer am Universitätsklinikum des Saarlandes rekrutiert, die anderen zehn waren Patienten im Forschungszentrum in Borstel. Der QuantiFERON-TB Gold Plus Test dieser zehn Studienteilnehmer wurde vor Ort in Borstel angewandt, um eine zeitnahe Durchführung des zu evaluierenden Tests nach der Blutentnahme zu gewährleisten. Dort wurde auf die zusätzliche Stimulation mit PPD verzichtet. Für die Durchführung der Durchflusszytometrie wurden uns für diese Studie Blutproben dieser Patienten sowie eines zusätzlichen Probanden mit aktiver Tuberkuloseerkrankung zur Verfügung gestellt. Mithilfe eines etablierten Versandsystems wurden die Proben an die Universitätsklinik des Saarlandes verschickt, wodurch die Lebensfähigkeit der Immunzellen in den einzelnen Proben gewährleistet werden konnte. Als aktive Tuberkulose wurde eine Tuberkulose definiert, welche durch direkte Nachweisverfahren bestätigt wurde. Vier der Patienten erzielten ein positives Ergebnis in der

Polymerase-Kettenreaktion, fünf Patienten wurden anhand der Ziehl-Nelson-Färbung entdeckt und drei Patienten wurden anhand der Kultur als positiv gewertet. In die altersgematchte Kontrollgruppe wurden Probanden eingeschlossen, die keine der oben genannten Kriterien erfüllten. Ein Ausschlusskriterium stellte eine HIV-Infektion dar. Weitere Details zu den Ein- und Ausschlusskriterien lassen sich Tabelle 1 entnehmen. Zusätzlich zum QuantiFERON-TB Gold Plus Test wurde bei 50 Probanden eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Dabei wurden vor allem Personen mit bekannter Reaktivität auf die Antigene des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests ausgewählt, um die reagierenden Zellen genauer beschreiben zu können. Dafür erfolgten erneute Blutentnahmen bei insgesamt neun Kontrollpersonen, 16 CRF, zehn SOTR, drei SCTR und zwölf aTB. Bis auf fünf CRF, eine Person mit Stammzelltransplantation und eine Person mit aktiver Tuberkulose zeigte sich das QuantiFERON-TB Gold Plus Testergebnis bei allen Probanden positiv.

Tabelle 1. Ein- und Ausschlusskriterien

	Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Gesamt	> 18 Jahre alt schriftliche Einverständniserklärung	< 18 Jahre alt fehlende schriftliche Einverständniserklärung HIV-Erkrankung
Kontrollen	immunkompetent	immunsupprimiert
CRF	terminale Niereninsuffizienz mit Nierenersatztherapie > 2 Monate	neu diagnostizierte Niereninsuffizienz mit kürzlich begonnener Nierenersatztherapie
SOTR	mindestens eine solide Organtransplantation (Niere, Pankreas, Lunge, Leber oder Kombination)	Funktionsverlust des transplantierten Organs
SCTR	mindestens eine autologe oder allogene Stammzelltransplantation (oder Kombination)	aktuelle Abstoßungsreaktion
RA	Erkrankung des rheumatischen Formenkreises mit regelhafter Vorstellung in der Rheumatologie der Uniklinik Homburg (rheumatoide Arthritis, Psoriasisarthritis, Lupus erythematoses, SAPHO-Syndrom, Spondyloarthritis, Morbus Still, Polyarthritis, Sarkoidose, Polymyalgia rheumatica, Polymyositis, granulomatöse Polyangiitis, Polymyalgie, Colitis ulcerosa, Mücke-Wells- Syndrom, primär systemische Vaskulitis)	fehlende Anbindung an Uniklinik Homburg
aTB	Diagnosesicherung durch direkte Nachweismethoden	fehlender direkter Erregernachweis

3.2 Geräte und Materialien

Die für die Durchführung des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests und der Durchflusszytometrie benötigten Geräte und Substanzen sind in den folgenden Tabellen 2-8 dargestellt:

Tabelle 2. Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Hersteller
Brutschrank (Hera cell 150 + 240i)	Heraeus, Hanau
Vortex Mixer 7-2020	neoLab Migge Laborbedarf, Heidelberg
Zentrifuge Megafuge 1. OR	Heraeus, Hanau
Safety-Multifly-Kanüle	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovetten EDTA (2,7 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovetten Lithium-Heparin (9 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Kolbenhubenpipetten (0,5-10 µl, 100-1000 µl)	Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen für Kolbenhubenpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
5 ml Polypropylen-Rundboden-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Röhrchen (5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Durchflusszytometer (FACS CANTO II)	BD Biosciences, Heidelberg
VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader	PerkinElmer Inc., Waltham, USA
Sterile Werkbank (Hera Safe + Hera Safe KS)	Heraeus, Hanau PerkinElmer, Rodgau

Tabelle 3. Inhalt des QuantiFERON-TB Gold Plus ELISA-Kits von Qiagen

Inhalt	Hersteller
QuantiFERON NIL-Röhrchen	Qiagen, Hilden Germany
QuantiFERON TB-1-Röhrchen	Qiagen, Hilden Germany
QuantiFERON TB-2-Röhrchen	Qiagen, Hilden Germany
QuantiFERON Mitogen-Röhrchen	Qiagen, Hilden Germany
Mikrotiterstreifen [12 x 18 Wells]	Qiagen, Hilden Germany
IFN- γ -Standard	Qiagen, Hilden Germany
Grüne Verdünnungslösung	Qiagen, Hilden Germany
Konjugatkonzentrat	Qiagen, Hilden Germany
Waschpufferkonzentrat	Qiagen, Hilden Germany
Enzymsubstratlösung	Qiagen, Hilden Germany
Enzymstopplösung	Qiagen, Hilden Germany
QFT-Plus Analyse Software	Qiagen, Hilden Germany

Tabelle 4. Chemikalien

Chemikalien	Firma
Natriumazid (NaN_3)	Serva, Heidelberg
Brefeldin A (BFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg
Paraformaldehyd (PFA)	AppliChem, Darmstadt
Saponin (SAP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua destilliert	Fresenius Kabi, Bad Homburg
FACS Clean, Flow, Rinse und Shutdown Solution	BD Biosciences, Heidelberg

Tabelle 5. Puffer und Medien

Puffer und Medien	Zusammensetzung
10 % NaN ₃ -Lösung	10 g NaN ₃ in 100 ml PBS
BFA-Stocklösung	5 mg/ml in Ethanol
FACS-Puffer	PBS, 5 % FCS, 0,5 % BSA, 0,07 % NaN ₃
4 % Paraformaldehyd-Stocklösung	Stocklösung 20 mM/ml Paraformaldehyd in PBS, pH 7,4-7,6
1 % Paraformaldehyd-Stocklösung	25 ml PFA-4 % +75 ml PBS Stocklösung 20 mM/ml in Aqua destilliert
5 % Saponin	2 g Saponin in 39,7 ml sterilem PBS + 0,28 ml 10 % NaN ₃
0,1 % Saponin-Puffer	FACS-Puffer, 0,1 % Saponin

Tabelle 6. Antigene und costimulatorische Antikörper

Stimulanz [Klon]	Konzentration Stocklösung (Endkonzentration Blut)	Firma
α-CD28 [L293]	500 µg/ml (1 µg/ml)	BD Biosciences, Heidelberg
α-CD49d [9F10]	1 mg/ml (1 µg/ml)	BD Biosciences, Heidelberg
ESAT-6/CFP-10	0,32 mg/ml (10 µg/ml)	Lionex, Braunschweig
PPD	1 mg/ml (7,32 µg/ml)	SSI, Kopenhagen
Staphylococcus aureus Enterotoxin B/E (SEB/SEE)	1 mg/ml (2,5 µg/ml)	Sigma, Steinheim

Tabelle 7. Antikörper mit gekoppelten Fluorochromen

Antikörpertarget	Fluorochrom	Klon
CD4	PE-Cy7	SK3
CD4	APC-H7	SK3
CD8	PerCP	SK1
CD8	V500	RPA-T8
CD69	Per-CP	L78
IFN- γ	FITC	4S.B3
IL-2	PE	MQ1-17H12
TNF- α	V450	MAb11

3.3 Durchführung des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests

Der QuantiFERON-TB Gold Plus Test stellt eine neue Generation zur Diagnostik einer Infektion mit *M. tuberculosis* dar. Das Testprinzip beruht auf einer *in vitro* Stimulation von Blutzellen mit dem MTB-Komplex assoziierten Antigenen ESAT-6 und CFP-10 und dem daraufhin exprimierten IFN- γ , dessen Konzentration mithilfe eines ELISAs quantifiziert wird. Die Bearbeitung der Blutproben richtete sich nach den Vorgaben der Herstellerfirma Qiagen zum QuantiFERON-TB Gold Plus Test, die im Folgenden vorgestellt werden.

Zur Testdurchführung konnte das Blut der Patienten direkt in die QuantiFERON-Röhrchen abgenommen werden oder alternativ konnte den Patienten Blut zunächst in ein Lithium-Heparin-Röhrchen entnommen werden. In dieser Studie wurde den Patienten jeweils 9 ml Blut in ein Lithium-Heparin-Röhrchen zur Testdurchführung und aus Studienzwecken zusätzlich 2,7 ml in ein EDTA-Röhrchen entnommen, um ein kleines Differenzialblutbild anzufertigen. Das EDTA-Röhrchen wurde im Zentrallabor analysiert und das Blut des Lithium-Heparin-Röhrchens wurde bei Raumtemperatur gelagert. Innerhalb von 16 Stunden wurde jeweils 1 ml Blut in jedes der vorgegebenen Röhrchen pipettiert. Dabei diente das NIL-Röhrchen als Negativkontrolle und das Mitogen-Röhrchen als Positivkontrolle. Am Boden aller Röhrchen befindet sich eine Gelbarriere, die bei der nach der Stimulation durchgeführten Zentrifugation dazu dient, das Plasma und die Zellen voneinander zu trennen. Die TB-1- und TB-2-Röhrchen sind an den Innenwänden jeweils mit getrockneten Peptiden von ESAT-6 und CFP-10 beschichtet, die Bestandteile des MTB-Komplexes sind und deswegen zellvermittelte Immunreaktionen auslösen sollen. Im Vergleich zum TB-1-Röhrchen enthält das TB-2-Röhrchen zusätzlich eine Kombination aus kleineren Peptiden von CFP-10. Um die Antigene der

Innenwände des Röhrchens zu lösen, musste jedes Röhrchen jeweils unmittelbar nach der Befüllung zehnmal kräftig geschüttelt werden, sodass die gesamte Innenwand mit Blut benetzt wurde. Danach wurden die Proben für 16-24 Stunden in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert. Anschließend wurden die Röhrchen für 15 Minuten bei 3000 x g (relative Zentrifugalbeschleunigung) zentrifugiert. Dabei trennte sich das Plasma von den Zellen durch die Gelbarriere. Anschließend wurde das Plasma, das sich oberhalb der Gelbarriere befand, in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und bei - 20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Neben den kommerziell erhältlichen Röhrchen des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests wurde ein Polypropylen-Rundboden-Röhrchen mit 450 µl Blut und 3,3 µl PPD in einer Konzentration von 1 mg/ml befüllt, mithilfe eines Vortexers vermischt und ebenfalls für 16-24 Stunden inkubiert. Alle weiteren Schritte waren identisch mit den Schritten der Qiagen-Röhrchen und werden im Folgenden genauer beschrieben.

Vor der Weiterverarbeitung mussten die Plasmaproben auf Raumtemperatur gebracht werden. Mit destilliertem Wasser wurde der IFN- γ -Standard rekonstituiert. Nach vollständiger Auflösung des Inhalts ergab sich eine Lösung mit einer Konzentration von 8,0 IU/ml. Diese zählte einerseits als S0-Standard und wurde andererseits zur Herstellung einer zunächst 1:2 Verdünnung von IFN- γ in grüner Verdünnungslösung und anschließender 1:4 Verdünnung genutzt. S1 enthielt 4,0 IU/ml, S2 1,0 IU/ml, S3 0,25 IU/ml und S4 0 IU/ml (nur grüne Verdünnungslösung), wodurch S4 als Nullstandard diente. Alle mussten als Doppelbestimmung getestet werden (Abbildung 1).

Empfohlenes Verfahren für Doppelbestimmung der Standards

- 4 Röhrchen mit „S1“, „S2“, „S3“ bzw. „S4“ beschriften.
- Je **150 µl** GD in S1, S2, S3 und S4 geben.
- 150 µl** des Kitstandards in S1 geben und gründlich mischen.
- 50 µl** von S1 in S2 überführen und gründlich mischen.
- 50 µl** von S2 in S3 überführen und gründlich mischen.
- GD allein** dient als Nullstandard (S4).

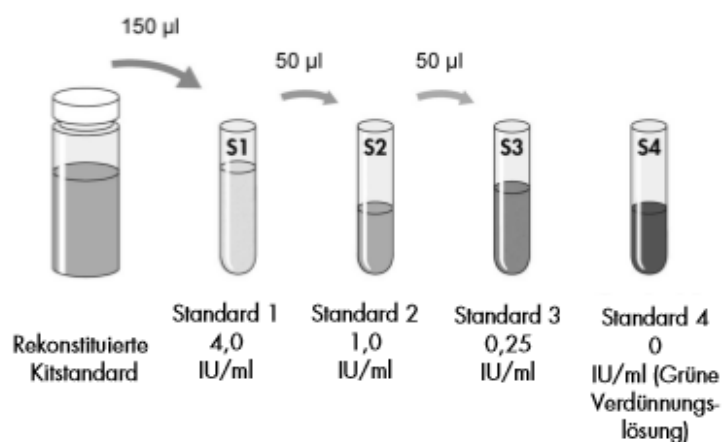


Abbildung 1. Herstellung des IFN- γ -Standards

(Quelle: QuantiFERON®-TB Gold (QFT®) ELISA Packungsbeilage)

Das lyophilisierte 100x Konjugatkonzentrat wurde mit 0,3 ml destilliertem Wasser rekonstituiert. Das gebrauchsfertig verdünnte Konjugat wurde hergestellt, indem man die erforderliche Menge des rekonstituierten 100x Konjugatkonzentrats in grüner Verdünnungslösung verdünnte. In alle benötigten Wells der ELISA-Platte wurden jeweils 50 µl des frisch zubereiteten, gebrauchsfertig verdünnten Konjugats mit einer Mehrkanalpipette pipettiert. Danach wurden je 50 µl der Plasmaproben in die entsprechenden Vertiefungen und anschließend 50 µl der Standards 1 bis 4 in die vorhergesehenen Bereiche gegeben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 N	3 N	5 N	7 N	9 N	S1	S1	13 N	15 N	17 N	19 N	21 N
B	1 TB1	3 TB1	5 TB1	7 TB1	9 TB1	S2	S2	13 TB1	15 TB1	17 TB1	19 TB1	21 TB1
C	1 TB2	3 TB2	5 TB2	7 TB2	9 TB2	S3	S3	13 TB2	15 TB2	17 TB2	19 TB2	21 TB2
D	1 M	3 M	5 M	7 M	9 M	S4	S4	13 M	15 M	17 M	19 M	21 M
E	2 N	4 N	6 N	8 N	10 N	11 N	12 N	14 N	16 N	18 N	20 N	22 N
F	2 TB2	4 TB1	6 TB1	8 TB1	10 TB1	11 TB1	12 TB1	14 TB1	16 TB1	18 TB1	20 TB1	22 TB1
G	2 TB2	4 TB2	6 TB2	8 TB2	10 TB2	11 TB2	12 TB2	14 TB2	16 TB2	18 TB2	20 TB2	22 TB2
H	2 M	4 M	6 M	8 M	10 M	11 M	12 M	14 M	16 M	18 M	20 M	22 M

Abbildung 2. Empfohlene Plattenbelegung (22 Tests pro Platte).

- S1 (Standard 1), S2 (Standard 2), S3 (Standard 3), S4 (Standard 4)
- 1 N (Probe 1, Negativkontrolle-Plasma), 1 TB1 (Probe 1, TB1-Plasma), 1 TB2 (Probe 1, TB2-Plasma), 1 M (Probe 1, Mitogen-Plasma)

Abbildung 2. Plattenbelegung

(Quelle: QuantiFERON®-TB Gold (QFT®) ELISA Packungsbeilage)

Durch die manuelle Mischung konnten sich Konjugat und Plasmaproben/Standards vermischen. Darauf folgend wurden die abgedeckten Platten für 120 ± 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde ein Teil 20 x Waschpufferkonzentrat mit 19 Teilen destilliertem Wasser verdünnt. Je 400 µl dieser Mischung wurden genutzt, um die Wells damit mindestens sechsmal zu waschen. Der Waschpuffer musste jeweils fünf Sekunden einwirken und alle Wells waren bis oben mit Waschpuffer gefüllt. Um noch vorhandenen Waschpuffer zu entfernen, wurden die Platten umgekehrt auf einem Papierhandtuch trocken geklopft. 100 µl der Enzymsubstratlösung wurden in jede Vertiefung hinzugefügt, anschließend die Wells abgedeckt und erneut gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 50 µl Enzymstopplösung in jedes Well beigefügt, sodass innerhalb von fünf Minuten nach dem Stoppen der Reaktion die optische Dichte jedes Wells mit einem Mikrotiterplatten-Photometer unter Verwendung eines 450 nm Filter und eines Referenzfilters zwischen 620 und 650 nm gemessen wurde. Die Analysesoftware des Herstellers diente der Berechnung der Ergebnisse, deren Interpretation durch die Herstellerangabe der Firma Qiagen erfolgte, die der folgenden Abbildung 3 zu entnehmen ist.

Negativkontrolle (IU/ml)	TB1 minus Negativkontrolle (IU/ml)	TB2 minus Negativkontrolle (IU/ml)	Mitogen minus Negativkontrolle (IU/ml)*	QFT-Plus Testergebnis	Bericht/Interpretation
≤ 8,0	≥ 0,35 und ≥ 25% der Negativkontrolle	Beliebig	Beliebig	Positiv [†]	Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> wahrscheinlich
	Beliebig	≥ 0,35 und ≥ 25% der Negativkontrolle			
	< 0,35 ODER ≥ 0,35 und < 25% der Negativkontrolle		≥ 0,5	Negativ	Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> NICHT wahrscheinlich
			< 0,5	Unschlüssig [‡]	Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> kann nicht ermittelt werden
> 8,0 [§]	Beliebig				

	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4
Rekonstituierte Kitstandard	4,0 IU/ml	1,0 IU/ml	0,25 IU/ml	0 IU/ml (Grüne Verdünnungslösung)

Abbildung 3. Interpretation des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests

(Quelle: QuantiFERON®-TB Gold (QFT®) ELISA Packungsbeilage)

3.4 Bildung der Differenz zwischen dem TB-2- und TB-1-Röhrchen

Qiagen als Hersteller des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests postuliert, dass durch die zusätzlichen kleineren Peptidfragmente von CFP-10 im TB-2-Röhrchen vermehrt CD8-T-Zellen zur IFN- γ -Produktion angeregt werden sollen, von denen ausgegangen wird, dass sie vor allem bei der Immunantwort einer aktiven Tuberkulose eine Rolle spielen. Die Differenz der beiden Röhrchen TB-2 und TB-1 sollte demnach die CD8-T-Zellantwort darstellen, da im TB-2-Röhrchen IFN- γ hauptsächlich durch CD8-T-Zellen und CD4-T-Zellen produziert wird, wohingegen die Antigene im TB-1-Röhrchen vor allem die CD4-T-Zellen zur IFN- γ -Herstellung anregen. Bei allen als positiv eingestuften Patienten wurde die Differenz der IFN- γ -Antworten zwischen den TB-2- und TB-1-Röhrchen gebildet (Abbildung 12). Dabei wurden nur die aTB als einzelne Gruppe aufgetragen und die Personen aller anderen Probandengruppen zum Kollektiv der latent Infizierten zusammengefasst. Basierend auf Studien von Metcalfe und Barcellini wurde eine Nachweisgrenze von 0,6 IU/ml für eine signifikante Differenz

zwischen den IFN- γ -Antworten im TB-2- und TB-1-Röhrchen übernommen, die für eine aktive Tuberkulose oder eine erst kürzlich stattgefundenene Infektion sprechen sollen [116, 117].

3.4.1 Berechnung der Sensitivität, Spezifität und des positiv prädiktiven Wertes

Die Spezifität des Tests wurde in dieser Arbeit erhoben, indem alle Patienten anhand eines Fragebogens ermittelt wurden, die keine Risikofaktoren für eine bestehende LTBI aufwiesen. Um die Sensitivität zu errechnen, wurden aTB als Referenzwert herangezogen. Zur Berechnung des positiv prädiktiven Wertes wurde eine Differenz von $> 0,6$ IU/ml sowohl bei den aTB als auch bei den Menschen mit LTBI gewählt. Dies erfolgte unter der Annahme, dass die Differenz von $> 0,6$ IU/ml der Unterscheidung einer aktiven von einer latenten Infektion mit Tuberkulose dienen soll.

3.4.2 Follow-up

Von den 438 an der Universität des Saarlandes rekrutierten Patienten erfolgte nach mindestens zwei Jahren bei 426 (97,2 %) eine erneute Befragung bzw. eine Untersuchung der Patientenakten hinsichtlich des *Outcomes*, der Einnahme einer Chemoprävention sowie der Entwicklung einer aktiven Tuberkulose (Tabelle 20). Zwölf Patienten konnten beim *Follow-up* aufgrund einer medianen Nachbeobachtungszeit von 0,25 Jahren nicht inkludiert werden.

3.5 Durchflusszytometrie

Um die reagierenden Zellen genauer identifizieren zu können, wurde bei insgesamt 50 Probanden zusätzlich eine durchflusszytometrische Messung mit sieben verschiedenen Stimuli durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde das NIL-Röhrchen des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests verwendet. Ebenso wurden die TB-1- und TB-2-Röhrchen dieses Tests als Stimuli benutzt sowie PPD, ESAT-6, CFP-10 und SEB (bzw. bei einem SEB-Nonresponder SEE). Als Detektionslimit (DL) der Durchflusszytometrie diente ein Wert von 0,05 %, der ursprünglich für CMV-spezifische T-Zellen detektiert wurde und sich im Bereich der Tuberkuloseforschung etablierte [89, 118]. Probanden mit bekannter Reaktivität basierend auf den zuvor beschriebenen QuantiFERON-TB Gold Plus Ergebnissen und davon unabhängigen Blutentnahmen wurden eingeschlossen. Insgesamt wurden neun Menschen aus der Kontrollgruppe erneut getestet sowie 16 CRF, zehn SOTR, drei SCTR und zwölf aTB. In der Gruppe der CRF wurden fünf der 16 Getesteten nach dem Befund des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests als negativ eingestuft sowie im Kollektiv der SCTR eine Person, die für die Korrelation der beiden Testverfahren herangezogen wurden. Alle Patienten aus der Kontrollgruppe sowie die SOTR hatten ein positives QuantiFERON-TB Gold Plus Ergebnis. Eine Person, die durch die direkten Nachweisverfahren die Diagnose einer aktiven Tuberkulose erhielt und im QuantiFERON-TB Gold Plus Test negativ gewertet wurde, wurde aufgrund der gesicherten Diagnose in allen FACS-Messungen zum Kollektiv der aTB gezählt. Zudem konnte, zusätzlich zu den elf Patienten der QuantiFERON-TB Gold Plus Analyse, ein weiterer Proband mit aktiver Tuberkulose für die FACS-Messung rekrutiert werden.

Zur genauen Differenzierung der Zellen mithilfe der durchflusszytometrischen Messung wurden die Blutproben vorher in drei verschiedenen Abschnitten bearbeitet. Zunächst wurden die Lymphozyten mit verschiedenen Antigenen stimuliert. Danach wurden unterschiedliche Oberflächenrezeptoren und intrazelluläre Zytokine der stimulierten T-Zellen angefärbt, die Zellen fixiert und anschließend die Messungen im Durchflusszytometer durchgeführt.

3.5.1 Stimulation der Immunzellen

Die Stimulation führt zur Aktivierung spezifischer T-Zellen und deren Zytokinausschüttung. Für diese wurden sieben verschiedene Stimuli verwendet, wobei das NIL-Röhrchen des QuantiFERON-TB Gold Plus der Firma Qiagen als Negativkontrolle diente. Zusätzlich wurden die TB-1- und TB-2-Röhrchen von Qiagen als Stimuli benutzt. Dabei wurde, wie zuvor beschrieben, jeweils 1 ml Blut in jedes Röhrchen pipettiert, diese geschüttelt und anschließend wurden 300 µl Blut dieser Röhrchen in ein Polypropylen-Röhrchen überführt. Des Weiteren dienten SEB, PPD, ESAT-6 und CFP-10 jeweils in ihren in Tabelle 6 beschriebenen Konzentrationen als Stimuli in 300 µl Vollblut. Dabei wurde in der Regel der polyklonale Stimulus SEB als Positivkontrolle verwendet. Dieser besitzt die Eigenschaft der antigenunabhängigen polyklonalen Stimulation durch die gleichzeitige direkte Bindung an Vβ-Ketten des T-Zellrezeptors und MHC-II-Moleküle der APC und der daraus resultierenden starken Zytokinproliferation. Bei fehlenden Vβ-Ketten des T-Zellrezeptors erfolgt auf SEB keine Zytokinexpression, wodurch diese Patienten als SEB-Nonresponder gelten. In solchen Fällen wird SEE verwendet, das zusätzlich an die α-Kette des T-Zellrezeptors binden kann. In dieser Studie musste bei einem Patienten SEE verwendet werden.

Anschließend wurden jeweils die costimulatorischen Antikörper α-CD28 und α-CD49d in einer Konzentration von je 1 µg/ml hinzugefügt und die Röhrchen für 2 Stunden im Brutschrank mit lose angeschraubten Deckeln bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe des Sekretionsinhibitors BFA in einer Konzentration von 10 µg/ml akkumulierten die Zytokine intrazellulär. Darauf folgend wurden die Proben für 4 Stunden erneut bei 37 °C inkubiert. Die folgenden Schritte dienten der Fixierung der Zellen, wozu zunächst die Zell-Zell-Kontakte getrennt und die Adhäsionen der Zellen von der Wand des Röhrchens gelöst werden mussten. Dies gelang durch das Hinzufügen von 2 mM EDTA (aus 20 mM Stocklösung) in jedes Röhrchen, die anschließend für zehn Sekunden durchmischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Das Beifügen von neun ml Becton Dickinson Lysingsolution pro Milliliter Vollblut führte nach dem Durchmischen der Röhrchen und einer erneuten Inkubationszeit von zehn Minuten bei Raumtemperatur zur Lyse der Erythrozyten und Fixierung der Zellen. Anschließend wurden die Röhrchen für sieben Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Um das entstandene Zellpellet zu lösen, wurde jedes Polypropylen-Röhrchen über ein Gitter gezogen. Durch die Zugabe von zwei ml FACS-Puffer (PBS-5 % FCS-0,5 % BSA-0,07 % NaN₃), dem sieben-minütigen Zentrifugieren bei 1300 rpm und anschließendem Absaugen wurde das Zellpellet gewaschen. Zuletzt

wurde das Zellpellet durch das Hinzufügen von 200 µl FACS-Puffer pro Röhrchen aufgenommen. An dieser Stelle war eine Lagerung über Nacht möglich, bevor die Zellen gefärbt wurden.

3.5.2 Intrazelluläre Zellfärbung

Die Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern diente dem Nachweis spezieller Zytokine sowie Oberflächenmoleküle der T-Zellen, wodurch sich deren quantitative und qualitative Eigenschaften differenzieren ließen.

Es wurden jeweils 200 µl der Zellsuspensionen auf FACS-Röhrchen verteilt. Die Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte durch das Hinzupipettieren von zwei ml Saponin-Puffer (FACS-Puffer/0,1 % Saponin) während einer Inkubationszeit von zehn Minuten bei Raumtemperatur. Die Permeabilisierung der Zellmembran stellte den wesentlichen Schritt zur intrazellulären Bindung der Antikörper dar. Nach Absaugen des Überstandes wurde eine Mischung aus Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, 5 % Saponin und FACS-Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl pro Probe hinzugefügt (Tabelle 8). Dies wurde anschließend durchmischt und für 30-45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert, bevor erneut drei ml FACS-Puffer zum Herauswaschen der nicht gebundenen Antikörper hinzugegeben wurden. Diese Lösung wurde bei 1300 rpm für sieben Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt, bevor das Zellpellet letztendlich in 150 µl 1 %-igem PFA aufgenommen wurde. Nach erneutem Mischen der Proben konnten diese bis zur Messung bei 4 °C gelagert werden.

Tabelle 8. Antikörpermengen des Färbeansatzes mit gekoppelten Fluorochromen

Antikörper	Fluorochrome	Menge[μl]
CD4	PE-Cy7	1,00
CD8	APC	0,50
CD69	PerCP	2,00
IFN- γ	FITC	0,50
IL-2	PE	2,00
TNF- α	V-450	1,00
SAP 5 %		1,00
FACS-Puffer		42,00
Gesamt		50

Die Antikörpermengen beziehen sich auf 300 μ l Vollblut.

3.5.3 Messung und Auswertung

Die Messung erfolgte mit dem Durchflusszytometer FACS CANTO II. Dabei saugte das Gerät die Probe durch eine Kapillare an und führte jede Zelle einzeln an einem Laser vorbei. Dadurch wurde das Licht des Lasers durch die Zelle gestreut. Das Vorwärtsstreulicht wurde durch den *Forward Scatter* (FSC) aufgefangen und gilt als Maß für die Größe und das Volumen der Zelle. Informationen über die Zellgranularität und die Zellkomplexität ergaben sich aus dem Seitwärtsstreulicht, das durch den *Side Scatter* (SSC) aufgenommen wurde. Die Unterscheidung zwischen Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten konnte so auch ohne Färbung erfolgen. Weitere Möglichkeiten zur Differenzierung verschiedener Zellen generierten die an Antikörper gekoppelten Fluorochrome, die durch Laserstrahlen angeregt wurden. Beim Zurückfallen auf ihr Grundniveau emittierten die unterschiedlichen Fluorochrome dabei Licht verschiedener Wellenlängen, welche durch Detektoren erfasst wurden und Hinweise über die vorher angefärbten Zellbestandteile wie Oberflächenmoleküle oder die exprimierten Zytokine lieferten. Über die Analysesoftware erfolgte die Generierung eines Dotplots. Die verschiedenen Zellpopulationen ließen sich durch Gatingstrategien weiter analysieren. Dabei wurden in dieser Arbeit einerseits die CD4-T-Zellen, die den Oberflächenmarker CD69 tragen und zusätzlich IFN- γ als Zytokin exprimieren, betrachtet und auf ihre Koexpression der Zytokine TNF- α und IL-2 untersucht (Abbildung 4). Andererseits wurden auf diese Koexpression ebenso die CD69-positiven- und

IFN-negativen-CD4-T-Zellen exploriert, sodass sich die Anzahl der CD4-T-Zellen, die entweder ein, zwei oder alle drei Zytokine exprimierten, bestimmen ließ. Das gleiche Vorgehen wurde in Bezug auf CD8-T-Zellen durchgeführt (Abbildung 5).

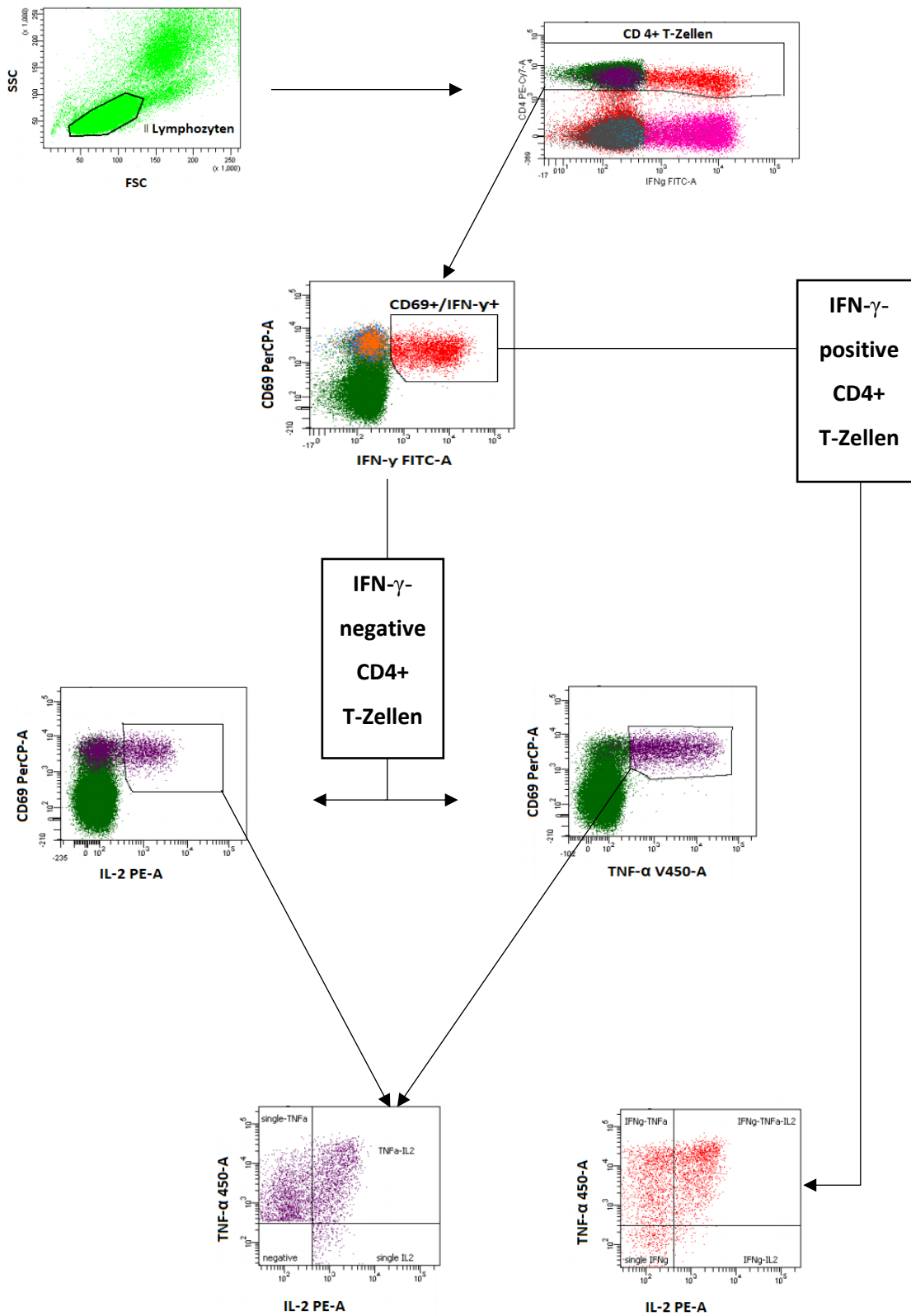


Abbildung 4. Gatingstrategie der Durchflusszytometrie von CD4-T-Zellen eines QuantiFERON-TB Gold Plus Test positiven Patienten mit dem Antigen SEB. Beginnend bei der Lymphozytenpopulation wurden die CD69-CD4-positiven-T-Zellen zunächst durch die vorhandene bzw. fehlende Koexpression von IFN- γ aufgeteilt und diese Subpopulationen anschließend auf das Vorhandensein von TNF- α und IL-2 untersucht.

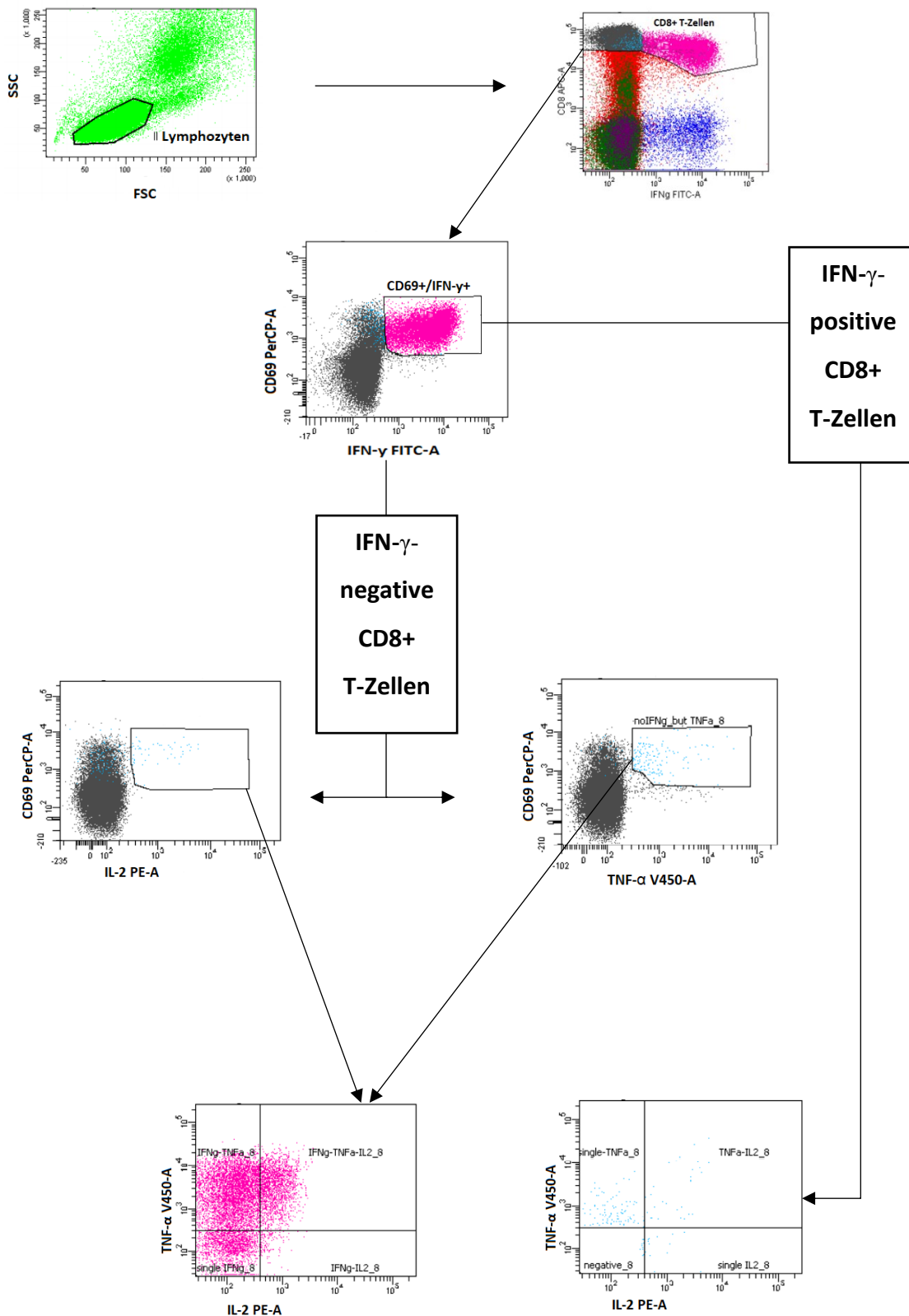


Abbildung 5. Gatingstrategie der Durchflusszytometrie von CD8-T-Zellen eines QuantIFERON-TB Gold Plus Test positiven Patienten mit dem Antigen SEB. Beginnend bei der Lymphozytenpopulation wurden die CD69-CD8-positiven-T-Zellen zunächst durch die vorhandene bzw. fehlende Koexpression von IFN- γ aufgeteilt und diese Subpopulationen anschließend auf das Vorhandensein von TNF- α und IL-2 untersucht.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der verschiedenen Daten und deren grafische Darstellung erfolgte mit der Graph Pad Prism Software 8.0. In Abhängigkeit der unterschiedlichen Auswertungen wurden die entsprechenden Testverfahren, wie beispielsweise der *Bartlett's test for equal variances* und der Kruskal-Wallis-Test, verwendet. Korrelationskoeffizienten wurden nach Spearman berechnet. Die jeweils angewandten Tests sind im Ergebnisteil in den jeweiligen Abbildungen beschrieben. Als statistische Signifikanz wurde ein p-Wert $<0,05$ vorausgesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Überblick Patientenkollektiv

Der QuantiFERON-TB Gold Plus Test wurde mit Blutproben von insgesamt 448 Personen durchgeführt, die in sechs verschiedene Probandengruppen eingeteilt wurden. Neben 84 gesunden Kontrollpersonen waren 81 CRF, 85 SOTR, 89 SCTR, 98 RA und elf aTB Teil der Studie. Insgesamt ergab sich eine gleichmäßige Geschlechtsverteilung mit einem Frauenanteil von 48,44 %. Das durchschnittliche Alter der Probanden betrug 57,61 Jahre. Die überwiegende Anzahl der Probanden stammte aus Deutschland. Von allen Teilnehmern ließ sich bei 13,6 % eine BCG-Impfung sicher evaluieren, wohingegen für 33,7 % eine BCG-Impfung ausgeschlossen werden konnte. Zudem ergab sich bei 53,3 % der Teilnehmenden eine Raucheranamnese. Weitere Details zu den Probandengruppen sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Der p-Wert des Alters wurde mit dem *Bartlett's test for equal variances* berechnet, die anderen p-Werte mit dem Chi-Quadrat-Test.

Tabelle 9. Überblick über das Patientenkollektiv

	Gesamt	Kon- trollen	CRF	SOTR	SCTR	RA	aTB	p-Werte
n (%)	448 (100)	84 (18,75)	81 (18,08)	85 (18,97)	89 (19,87)	98 (21,88)	11 (2,46)	
Alter, Jahre MW±SD	57,61± 16,23	57,35± 18,78	68,11± 14,53	55,34± 14,25	56,50± 13,14	53,20± 15,20	46,07± 20,59	0,017
Geschlecht m/w (%)	231/217 (48,44)	39/45 (53,57)	54/27 (33,33)	42/43 (50,6)	57/32 (35,96)	29/69 (70,4)	10/1 (9,1)	<0,0001
BCG-Impfung ja/nein (%)	60/151 (33,7)	12/42 (50)	13/28 (34,6)	9/20 (23,5)	12/26 (29,2)	12/34 (34,7)	2/1 (9)	<0,0001
Raucher ja/nein (%)	207/209 (46,7)	18/65 (77,3)	46/34 (41,9)	40/34 (40)	47/31 (34,8)	48/43 (43,9)	8/2 (18,2)	0,49
Immigrant ja/nein (%)	55/362 (80,8)	4/79 (94)	5/74 (91,31)	14/59 (69,4)	15/65 (73)	8/84 (85,7)	9/1 (9)	<0,0001

4.2 Überblick über die QuantiFERON-TB Gold Plus Ergebnisse

Die Ergebnisse des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests ließen sich für alle Probanden auswerten (Tabelle 10). Aufgrund einer zu geringen Reaktivität in der Positivkontrolle kam es bei fünf Probanden zu einem unschlüssigen (*indeterminate*) Befund. Dieser fand sich bei einem Dialysepatienten, einem organ- und einem stammzelltransplantierten Patienten sowie bei zwei RA. Insgesamt betrachtet ergaben sich überwiegend übereinstimmende Ergebnisse im TB-1- und TB-2-Röhrchen (98,21 %). Bei 390 Probanden (87 %) fand sich ein negatives Testresultat. Bei 1,79 % der Studienteilnehmer stimmte die Auswertung der beiden Röhrchen nicht überein. Dabei erzielten drei Personen nur im TB-1-Röhrchen ein positives Testergebnis für eine LTBI, wohingegen fünf nur im TB-2-Röhrchen positiv getestet wurden.

Tabelle 10. Überblick QuantiFERON-TB Gold Plus Ergebnisse

	TB-1	TB-2	TB-1 und TB-2 übereinstimmend	TB-1 und/oder TB-2
Positiv	48	50	45	53
Negativ	395	393	390	390
Indeterminate	5	5	5	5

4.3 Gruppenspezifische Auswertung des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests

Bei der Auswertung des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests diente das NIL-Röhrchen als Negativkontrolle und stellte die Hintergrundreaktion des Immunsystems dar, weshalb die IFN- γ -Antwort dort in der Regel am geringsten ausfiel. In dieser Studie lag der Median der ersten fünf Probandengruppen in diesem Stimulationsansatz bei 0,00 IU/ml, wohingegen das Kollektiv der aTB einen Median von 0,11 IU/ml zeigte. Im Vergleich dazu fiel die Antwort in der Positivkontrolle, dem Mitogen-Röhrchen, bei der Mehrzahl der Patienten am stärksten aus, wodurch eine adäquate Immunantwort repräsentiert wurde. Die NIL- und Mitogen-Antwort unterschied sich in allen Probandengruppen signifikant ($p < 0,0001$, die p -Werte wurden mit dem *Dunn's Multiple Comparison Test* berechnet). Ebenso zeigte sich eine signifikante Differenz sowohl zwischen der TB-1- und der Mitogen-Antwort als auch zwischen der TB-2- und der Mitogen-Antwort ($p < 0,0001$) in allen Patientenkollektiven außer den aTB. Dort ergab sich kein Unterschied zwischen dem Stimulus TB-1/TB-2 und Mitogen ($p = 0,45/p = 0,49$). Es fiel auf, dass in der Kontrollgruppe alle Personen eine starke Mitogen-Reaktion aufwiesen, wohingegen einzelne Menschen in den Patientenkollektiven mit einer abgeschwächten IFN- γ -Antwort reagierten. Der Median lag dennoch in den ersten fünf Probandengruppen beim im Test messbaren Höchstwert von 12 IU/ml und bei den aTB bei 10 IU/ml. Beim Vergleich der Reaktionen des Immunsystems im TB-1- und TB-2-Röhrchen, fiel innerhalb einer Gruppe kein signifikanter Unterschied auf (Abbildung 6, 7). Die höchsten IFN- γ -Antworten in diesen Röhrchen fanden sich bei den aTB, bei denen der Median im TB-1-Röhrchen bei einem Wert von 0,84 IU/ml und im TB-2-Röhrchen von 0,89 IU/ml lag. Laut Herstellerangabe muss die Hintergrundreaktivität von den Reaktivitäten nach spezifischer Stimulation abgezogen werden, sodass die normierten Werte zur endgültigen Auswertung herangezogen werden können (Abbildung 7). Die IFN- γ -Antworten stellten sich bei diesen normierten Werten für das Mitogen-Röhrchen ähnlich denen der vorherigen Abbildung dar. Alle Probandenkollektive hatten eine mediane IFN- γ -Antwort von 12 IU/ml, mit Ausnahme der SCTR, deren Median bei 11,98 IU/ml lag und der aTB, deren Median 9,87

IU/ml betrug. Eine ausreichende Immunantwort der Probanden zeigte sich durch die allgemeine Reaktivität der Positivkontrolle mit einem durchschnittlichen Median von 12 IU/ml. Erneut stellte sich die Reaktion auf das TB-1-Röhrchen und das TB-2-Röhrchen im Vergleich zum Mitogen-Röhrchen in den ersten fünf Probandengruppen signifikant niedriger dar ($p < 0,0001$). In Bezug auf die aTB ließ sich nur eine Signifikanz zwischen dem TB-1-Röhrchen und dem Mitogen-Röhrchen herausstellen ($p = 0,047$). Auch nach der Normierung war unter allen Kontrollprobanden eine deutliche Reaktivität in der Positivkontrolle detektierbar, wohingegen in den immunbeeinträchtigten Probandengruppen einzelne Personen schwächer reagierten.

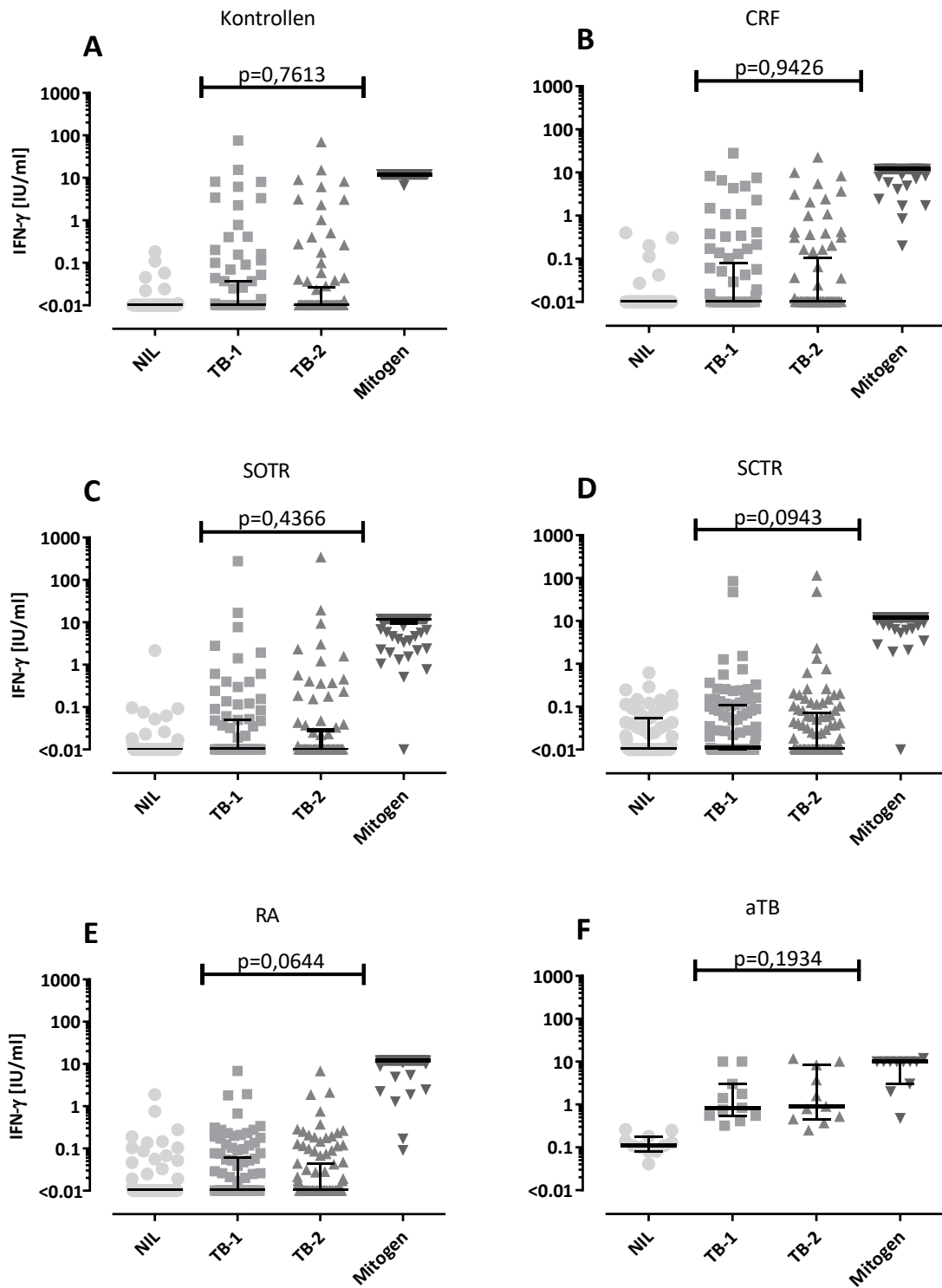


Abbildung 6. Darstellung der IFN- γ -Antworten [IU/ml] der einzelnen Probandengruppen pro Röhrchen. Dargestellt sind jeweils die IFN- γ -Antworten als Reaktion auf die Negativkontrolle (NIL), auf die Stimulation mit den verschiedenen *M. tuberculosis*-Antigengemischen (TB-1, TB-2) und der Positivkontrolle (Mitogen) für Kontrollprobanden (n=84), CRF (n=81), SOTR (n=85), SCTR (n=89), RA (n=98) und aTB (n=11). P-Werte beziehen sich auf den Vergleich zwischen TB-1- und TB-2-Röhrchen in den jeweiligen Gruppen und wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test berechnet. Balken repräsentieren den Median und den Interquartilsabstand (IQR).

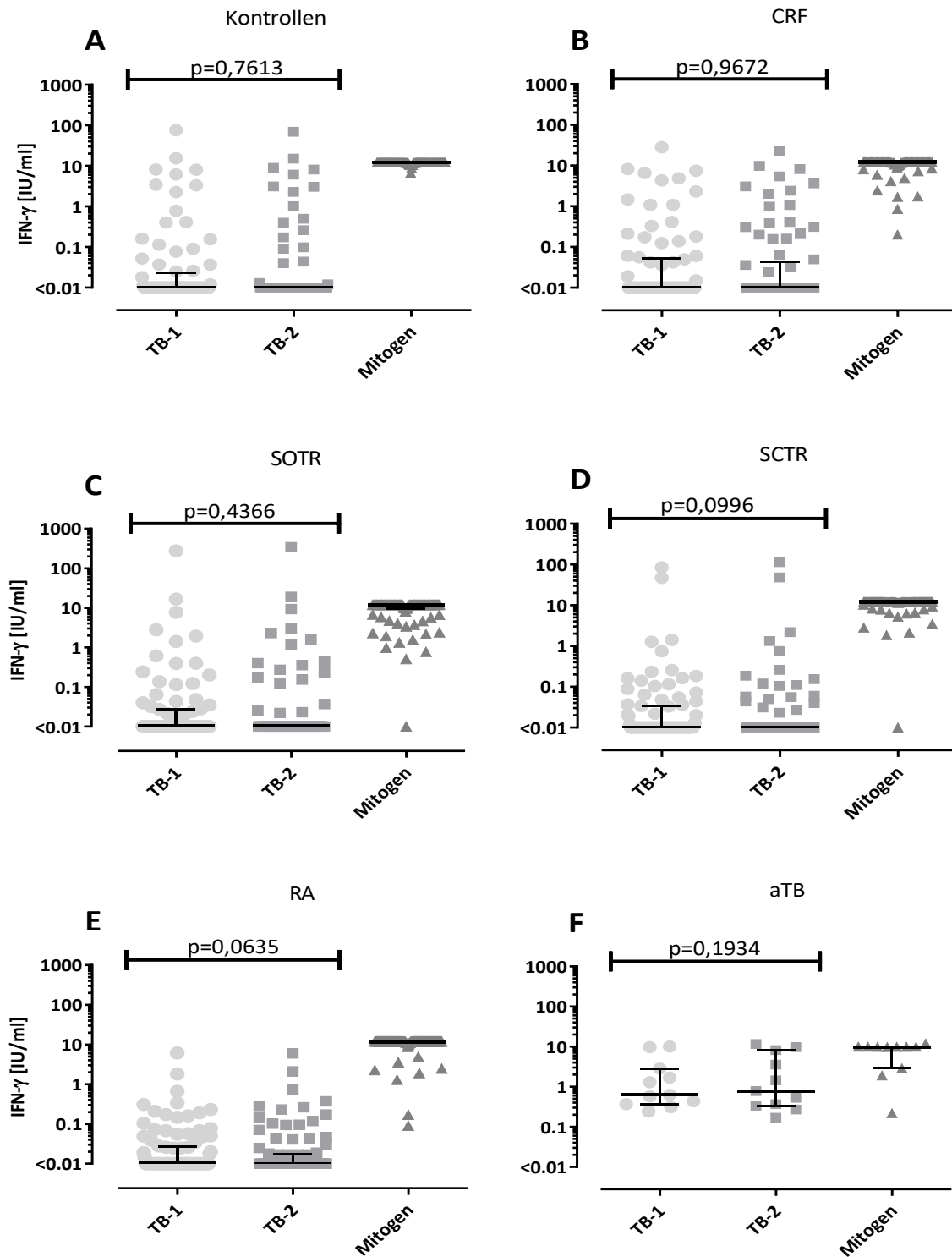


Abbildung 7. Darstellung der normierten IFN- γ -Antworten [IU/ml] der einzelnen Probandengruppen pro Röhrchen. Dargestellt sind jeweils die normierten Werte nach Abzug der Reaktivität in der Negativkontrolle als Reaktion auf die Stimulation mit den verschiedenen *M. tuberculosis*-Antigengemischen (TB-1, TB-2) und der Positivkontrolle (Mitogen) für Kontrollprobanden (n=84), CRF (n=81), SOTR (n=85), SCTR (n=89), RA (n=98) und aTB (n=11). Die errechneten p-Werte beziehen sich auf den Vergleich der IFN- γ -Antwort zwischen dem TB-1- und TB-2-Röhrchen pro Patientengruppe, die mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test errechnet wurden. Balken repräsentieren den Median und den IQR.

4.3.1 TB-1- und TB-2-Röhrchen spezifische Auswertung und Korrelation

Nachfolgend werden die IFN- γ -Antworten der einzelnen Patientengruppen jeweils im TB-1 und TB-2-Röhrchen miteinander verglichen (Abbildung 8).

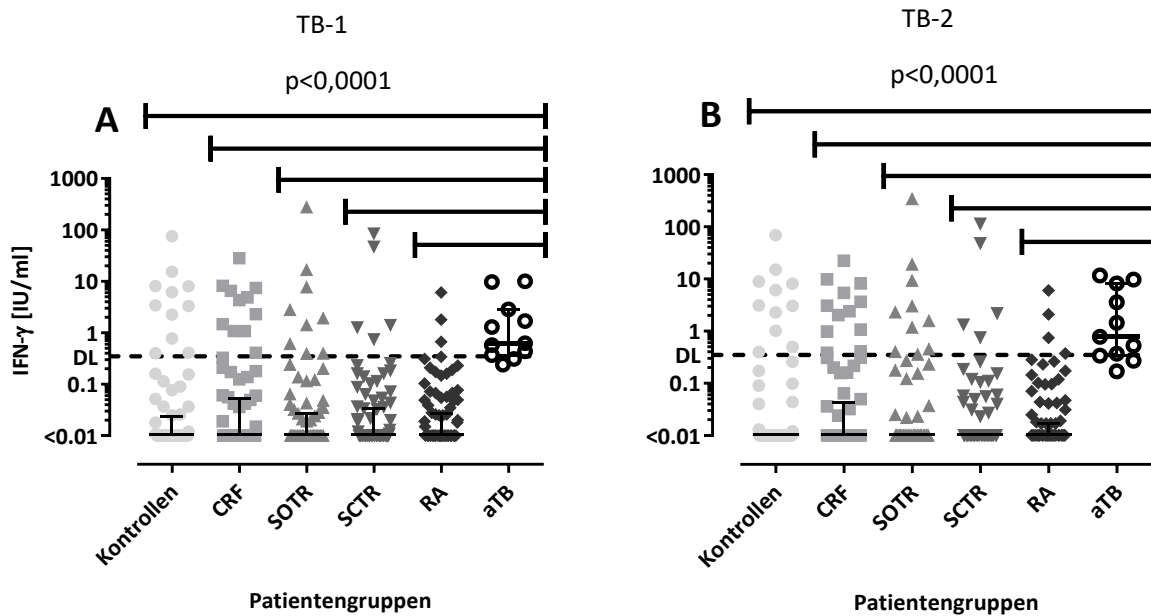


Abbildung 8. TB-1- und TB-2-IFN- γ -Antwort der verschiedenen Patientengruppen im Vergleich. Dargestellt sind die normierten Werte als Reaktion auf die Stimulation mit den verschiedenen *M. tuberculosis*-Antigengemischen in den Röhrchen TB-1 (Panel A) und TB-2 (Panel B) für die Kontrollprobanden (n=84), CRF (n=81), SOTR (n=85), SCTR (n=89), RA (n=98) und aTB (n=11). Die Signifikanz der p-Werte wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test errechnet. Als Posttest wurde der *Dunn's Multiple Comparison Test* verwendet. Die gestrichelte Linie stellt das DL dar. Balken repräsentieren den Median und den IQR.

Insgesamt stellten sich die Reaktivitätsmuster der einzelnen Gruppen untereinander sowohl für die Stimuli TB-1 als auch TB-2 ähnlich dar. Eine Ausnahme davon bildeten die IFN- γ -Antworten der aTB, die zu allen anderen Kollektiven einen signifikanten Unterschied ($p < 0,0001$) aufwiesen. Um die Relevanz der *M. tuberculosis* spezifischen Reaktivitäten zu analysieren, liegt im Folgenden das Augenmerk auf den Patienten, deren Test als positiv eingestuft wurde (Abbildung 9).

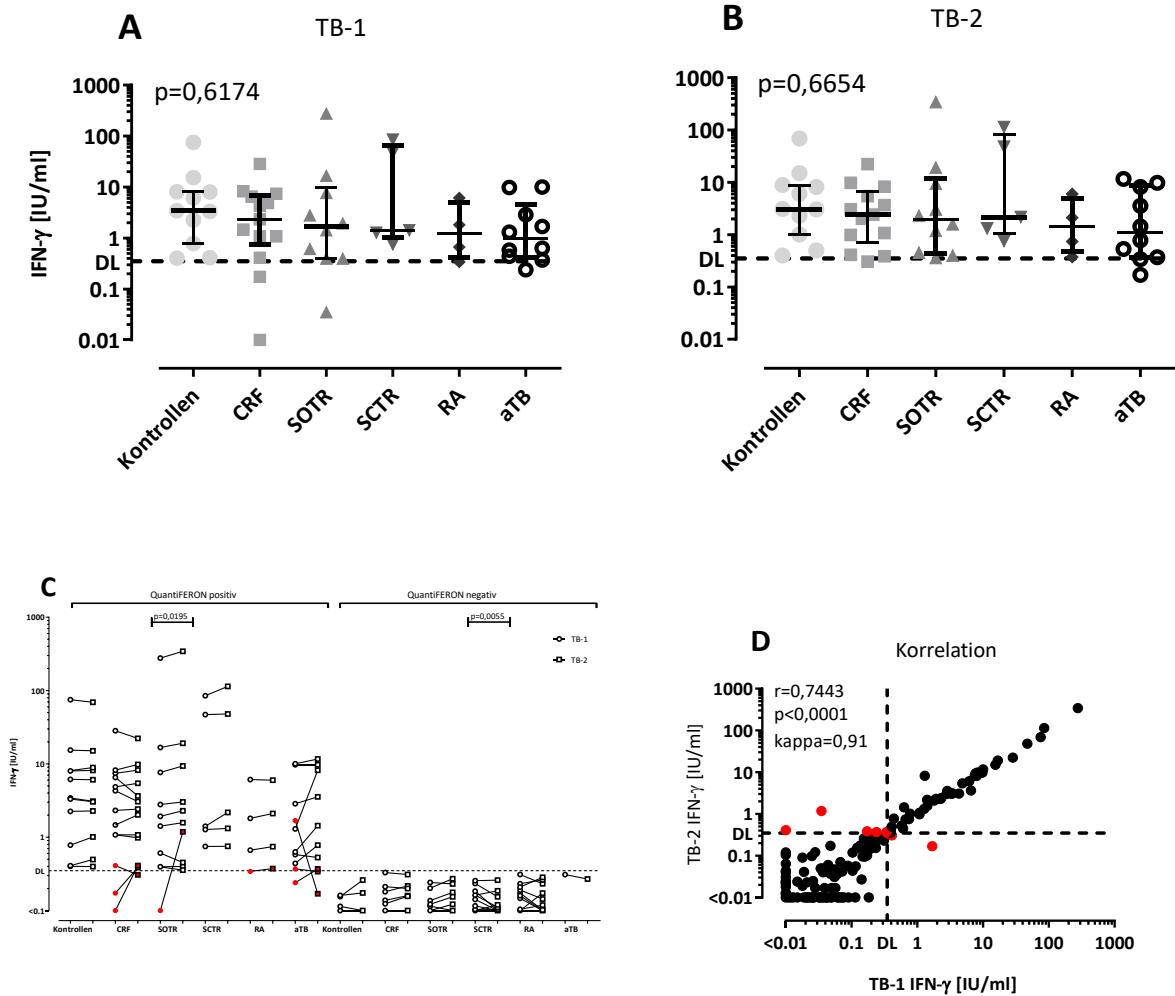


Abbildung 9. Direkte Vergleiche der TB-1- und TB-2-Antworten. Für alle als positiv gewerteten Probanden zeigt Panel A die IFN- γ -Antworten im TB-1-Röhrchen und Panel B die IFN- γ -Antworten im TB-2-Röhrchen (Kontrollen n=11, CRF n=13, SOTR n=10, SCTR n=5, RA n=4, aTB n=10). Panel C verbindet die Antworten der Probanden aus Panel A und B miteinander und vergleicht zusätzlich die Probandenantworten der als negativ eingestuft Patienten (QuantIFERON negativ: Kontrollen n=73, CRF n=67, SOTR n=74, SCTR n=83, RA n=92, aTB n=1). Dabei wird die Höhe der TB-1-Antwort durch einen Kreis repräsentiert und die der TB-2-Antwort durch ein Quadrat. Probanden, deren Ergebnis sich im TB-1- und TB-2-Röhrchen unterschied, sind in Panel C und D jeweils mit einem roten Symbol gekennzeichnet. Panel D veranschaulicht die Korrelation der beiden Röhrchen untereinander (n=443). Zur statistischen Analyse wurden jeweils der Friedman Test (A und B), der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (C) und die Korrelationsanalyse nach Spearman (D) verwendet. Die in allen Panels gestrichelte Linie stellt das DL für ein positives Testergebnis laut Herstellerangabe bei 0,35 IU/ml dar.

Ein positives Testergebnis wurde laut Herstellerangabe bei Patienten deklariert, deren normierte IFN- γ -Antworten im TB-1-Röhrchen und/oder im TB-2-Röhrchen eine Höhe von $\geq 0,35$ IU/ml erreichten und bei denen die normierten IFN- γ -Antworten ≥ 25 % der Negativkontrolle entsprach. Diese Befunde setzten sich zusammen aus elf Kontrollprobanden, 13 CRF, zehn SOTR, fünf SCTR, vier RA und zehn aTB. Interessanterweise wurde ein Patient mit aktiver Tuberkulose anhand des Ergebnisses weder im TB-1- noch im TB-2-Röhrchen als positiv eingestuft, weshalb diese Person in diese Auswertung nicht

einbezogen wurde. Die Höhe der Reaktivitäten im TB-1- und TB-2-Röhrchen unterschied sich auch bei alleiniger Betrachtung der als positiv eingestuften Probanden jeweils nicht zwischen den einzelnen Gruppen (TB-1: $p=0,6174$, TB-2: $p=0,6654$, Abbildung 9 A, B). Insgesamt ergab sich bei acht Probanden ein divergentes Testergebnis bei der Betrachtung des TB-1- und TB-2-Röhrchens. Auf die TB-1-Stimulation reagierten dabei zwei CRF, ein Organtransplantiertes, ein Patient mit einer rheumatischen Erkrankung und ein Patient mit aktiver Tuberkuloseerkrankung unterhalb der Nachweisgrenze, die daher nur anhand des TB-2-Röhrchens mit einem positiven Testresultat eingestuft wurden. Im Vergleich wurde durch das Testergebnis des TB-2-Röhrchens ein Dialysepatient und zwei aTB als nicht erkrankt eingestuft, die nur durch das TB-1-Röhrchen als positive Probanden erkannt wurden. Insgesamt zeigten sich jedoch bis auf zwei Ausnahmen alle IFN- γ -Werte in der Nähe des DL. Die Höhe der IFN- γ -Sekretion in den einzelnen Röhrchen pro Patientenkollektiv unterschied sich bei den QuantiFERON-TB Gold Plus positiven Menschen nur in der Gruppe der SOTR signifikant ($p=0,0195$). Dabei lag der Median im TB-2-Röhrchen mit einem Wert von 1,939 IU/ml höher als der des TB-1-Röhrchens (1,673 IU/ml). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den QuantiFERON-TB Gold Plus negativen Probanden nur im Kollektiv der SCTR ein signifikanter Unterschied zwischen den TB-1- und TB-2-Antworten ($p=0,0055$). Die mediane IFN- γ -Antwort lag hingegen bei beiden Röhrchen bei 0,0 IU/ml. Um die Übereinstimmung zwischen dem TB-1- und TB-2-Röhrchen zu quantifizieren, wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet (Abbildung 9 D). Sowohl in der Gruppe der negativ getesteten Menschen als auch im Kollektiv der positiv getesteten Personen ergab sich eine signifikante Korrelation nach Spearman (jeweils $p<0,0001$). Diese stellte sich in der negativen Gruppe als mäßige ($r=0,5981$), in der positiven Gruppe ($r=0,9340$) hingegen als sehr gute Übereinstimmung nach Spearman dar. In der Zusammenschau aller Probanden zeigte sich demnach eine insgesamt gute Korrelation nach Spearman ($p<0,001$, $r=0,7443$). Die Übereinstimmung der Testergebnisse mit einem Cohens-Kappa-Wert von 0,91 (Tabelle 11) verdeutlichte die starke Korrelation der beiden Röhrchen. Von den acht als unterschiedlich getesteten Patienten ließen sich nur zwei eindeutig abgrenzen. Die restlichen sechs Patienten befanden sich im Grenzbereich des DLs (Abbildung 9 D).

Tabelle 11. Vierfeldertafel der TB-1- und TB-2-Ergebnisse

	TB-1 positiv	TB-1 negativ
TB-2 positiv	45	5
TB-2 negativ	3	390

Kappa für positive Ergebnisse: 0,849, Kappa für negative Ergebnisse: 0,979, Gesamt-Kappa: 0,91

4.3.2 Einteilung nach QuantiFERON-TB Gold Plus Ergebnissen

Zur genaueren Evaluation der Aussagekraft des Tests wurden die Probandengruppen anhand ihres QuantiFERON-TB Gold Plus Testergebnisses in drei verschiedene Kollektive eingeteilt. Die Personen, die durch direkte Nachweisverfahren wie beispielsweise der Anzucht von Bakterien auf Kulturmedien sicher als aTB evaluiert worden sind, bildeten dabei die Gruppe der aktiven Tuberkulosen. Die anderen Probandenkollektive wurden anhand ihres QuantiFERON-TB Gold Plus Testergebnisses in negativ oder latent eingeteilt. Dabei wurden jene Patienten als latent eingestuft, die anhand ihrer normierten Werte entweder im TB-1- und/oder im TB-2-Röhrchen eine IFN- γ -Antwort über dem bereits zuvor beschriebenen DL erreichten und deren normierte IFN- γ -Antwort $\geq 25\%$ der Negativkontrolle betrug.

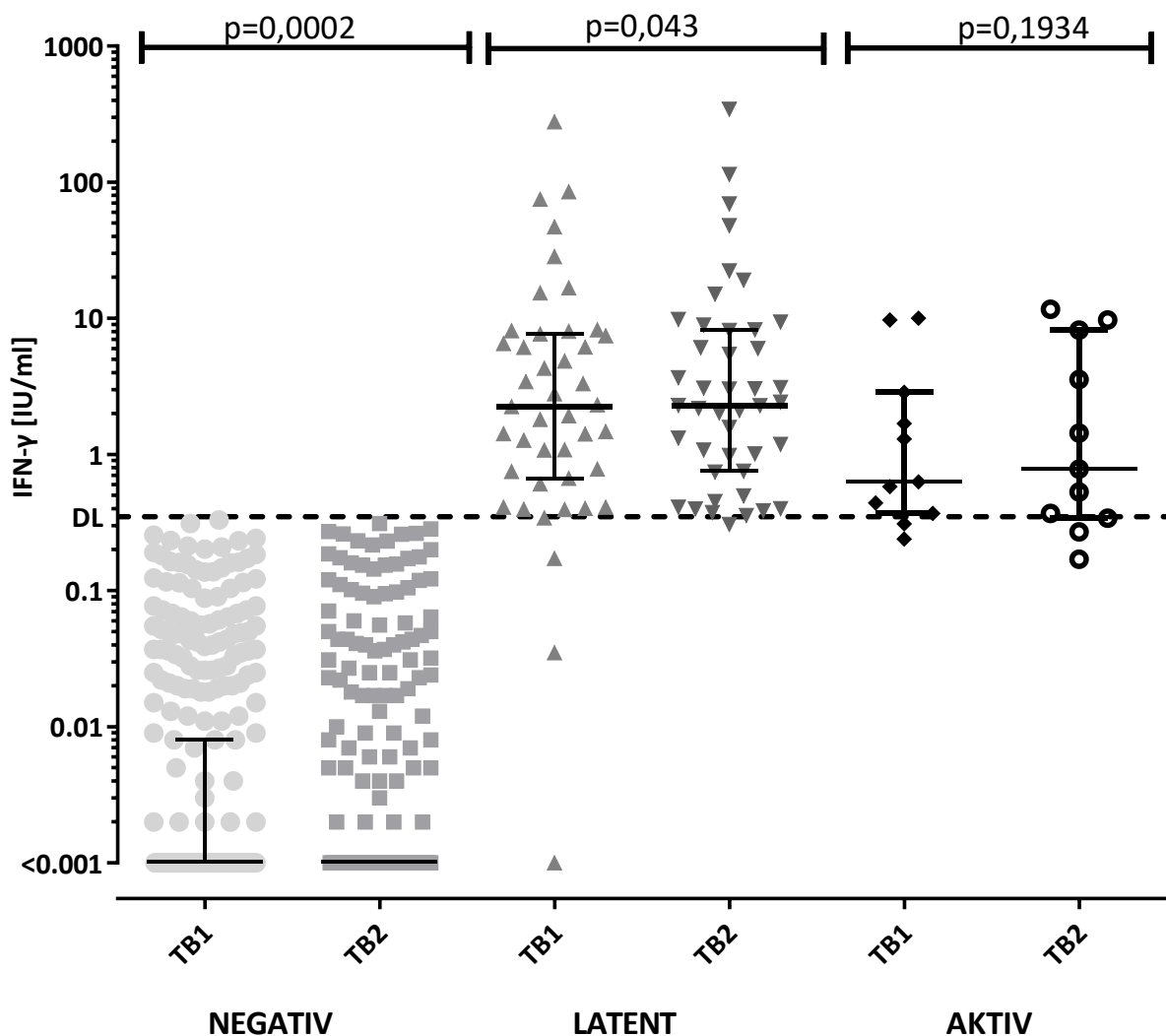


Abbildung 10. Evaluation des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests. Die Gruppen wurden anhand des Ergebnisses des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests in negativ (n=389) oder latent (n=43) eingeteilt. Die Gruppe der aktiven Tuberkulosen (n=11) wurde durch direkte Nachweisverfahren kategorisiert. P-Werte wurden anhand des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests berechnet. Die gestrichelte Linie stellt das DL bei 0,35 IU/ml dar. Balken repräsentieren den Median und den IQR.

Durch diese Einteilung ließen sich nun, unabhängig vom Immunstatus der Probanden, Unterschiede zwischen den Reaktivitäten in beiden Röhren herausstellen. Die IFN- γ -Antworten der negativen Probanden unterschied sich signifikant ($p=0,0002$), obwohl die mediane Reaktivität in beiden Röhren 0,0 IU/ml betrug. Ebenso fand sich ein signifikanter Unterschied bei den latenten Patienten ($p=0,043$), mit einer medianen IFN- γ -Antwort von 2,25 IU/ml im TB-1-Röhren und 2,29 IU/ml im TB-2-Röhren. Da die Anzahl der aTB sich nicht veränderte, ließ sich dort weiterhin kein signifikanter Unterschied feststellen ($p=0,1934$). Beim Vergleich der IFN- γ -Antworten auf die Stimulation des TB-1-Röhrens der latenten und der aktiven Probanden ergab sich ebenso wie beim Vergleich der IFN- γ -Antworten auf das TB-2-Röhren zwischen diesen beiden Kollektiven kein signifikanter Unterschied (jeweils $p=0,15$). Auffallend erschienen die drei latenten Personen, die mit ihrer IFN- γ -Antwort auf TB-1 deutlich unterhalb des DLs reagierten. Da es keinen Goldstandard für die Detektion einer LTBI gibt, bleibt die Frage offen, ob diese Probanden durch das zusätzliche TB-2-Röhren als richtig-positiv oder falsch-positiv eingestuft wurden. Um in dieser Hinsicht einen weiteren Hinweis für eine mögliche echte Infektion zu gewinnen, wurden alle Patientenproben mit Ausnahme der aTB zusätzlich in einem weiteren Stimulationsansatz mit dem Antigen PPD inkubiert. PPD gilt als nicht spezifisches Antigen in der Infektionsdiagnostik mit *M. tuberculosis*, da es ein Peptidgemisch aus vielen mykobakteriellen Antigenen darstellt, weswegen geimpfte Probanden und Menschen mit Kontakt zu anderen Mykobakterien-Stämmen wie beispielsweise *M. bovis*, *M. kansasii* oder *M. marinum*, positiv auf dieses Antigen reagieren können. Von den 389 QuantiFERON negativen Menschen zeigten 249 (64 %) eine starke Reaktion auf PPD (Tabelle 12 und Abbildung 11). 140 QuantiFERON negative Patienten (36 %) reagierten ebenso auf PPD negativ. In der Gruppe der QuantiFERON positiven Probanden reagierten fast alle (93 %) deutlich positiv auf PPD. Auffällig erschienen allein die drei Studienteilnehmer, die im PPD-Stimulationsansatz als negativ eingestuft wurden, wenn das DL dem des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests gleichgesetzt wurde. Alle drei galten ausschließlich aufgrund eines Röhrens als positive Probanden, wobei eine Person nur anhand der Reaktivität im TB-1-Röhren und zwei Menschen durch die Reaktivität im TB-2-Röhren als Personen mit LTBI eingestuft wurden.

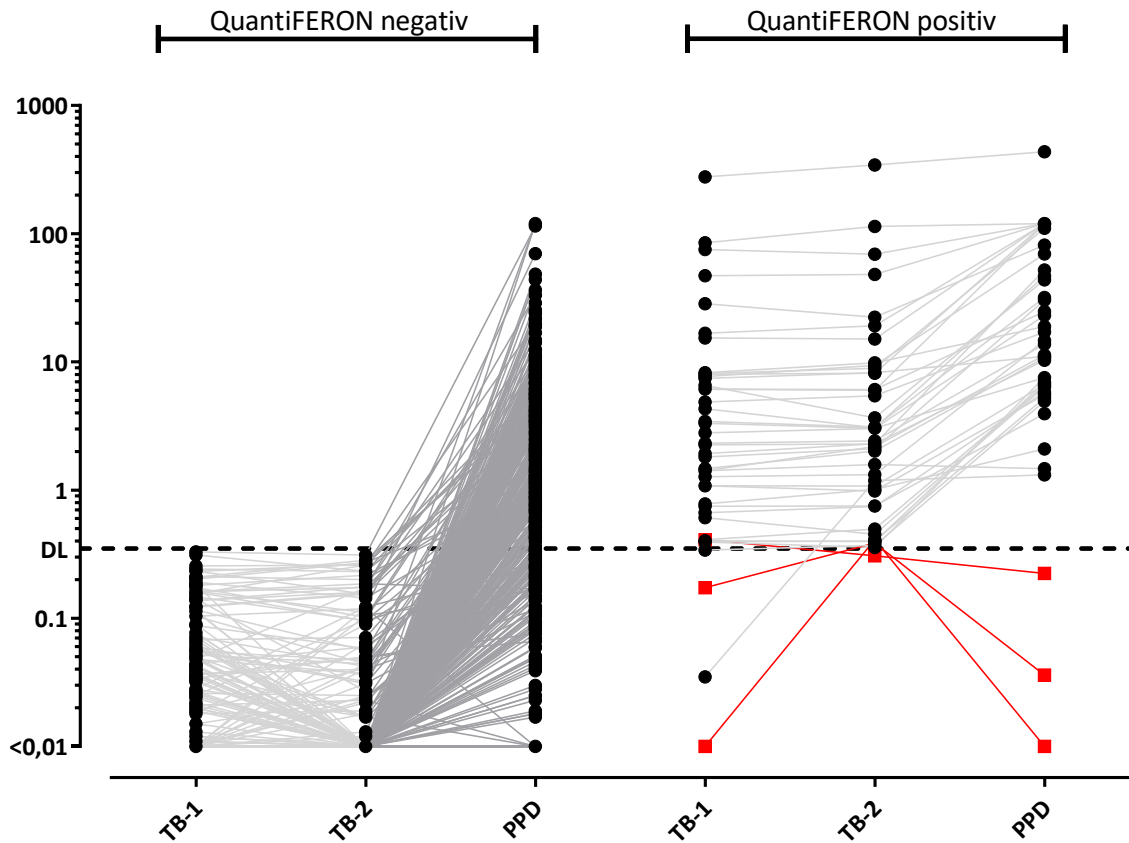


Abbildung 11. Vergleichende Darstellung der IFN- γ -Expression der Probanden mit Ausnahme der aTB auf die Stimuli TB-1, TB-2 und PPD. Die Personen, die im QuantiFERON-TB Gold Plus Test als negativ eingestuft wurden (n=389), sind links dargestellt, die als positiv eingestuft (n=43) rechts. Die roten Symbole repräsentieren die Patienten, bei denen sich eine Divergenz zwischen dem QuantiFERON Test und dem PPD-Ergebnis ergab. Die gestrichelte Linie bei 0,35 IU/ml stellt das DL dar.

Tabelle 12. QuantiFERON vs. PPD

	PPD negativ	PPD positiv
QuantiFERON negativ	140	249
QuantiFERON positiv	3	40

4.4 Logistische Regression

Um potenzielle Einflussfaktoren der Probanden für ein positives PPD bzw. ein positives QuantiFERON-TB Gold Plus Testergebnis zu evaluieren, wurden logistische Regressionsanalysen durchgeführt (Tabelle 13, 14). Dabei wurde die Kontrollgruppe jeweils als Standardgruppe gewählt. Die untersuchten Merkmale waren einerseits die unterschiedlichen Probandengruppen, andererseits das Geschlecht, der Impf- sowie Immigranten-Status, eine Diabetes mellitus Erkrankung, die Ethnie sowie der Raucherstatus. Patientengruppen erzielten dabei mit signifikant höherer Wahrscheinlichkeit ein negatives PPD-Testresultat im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die weiteren untersuchten Einflussfaktoren beeinflussten ein positives PPD-Testergebnis nicht signifikant. Im Vergleich dazu unterschieden sich die Gruppen hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit, ein positives QuantiFERON-TB Gold Plus Testresultat zu erzielen, nur in Bezug auf das Geschlecht. Männer hatten im Gegensatz zu Frauen eine 2,4-fach höhere und somit signifikant höhere Wahrscheinlichkeit positiv getestet zu werden.

Tabelle 13. Logistische Regression für PPD-Ergebnisse

		Total n	Odds Ratio	95 % Konfidenz-Intervall	Standard Fehler	p-Wert
Patienten- gruppen	Kontrollen	83	1			
	CRF	79	0,27	0,11; 0,66	0,12	0,004
	RA	91	0,24	0,1; 0,53	0,98	0,001
	SOTR	72	0,22	0,1; 0,52	0,97	0,001
	SCTR	79	0,1	0,04; 0,21	0,04	0,001
Geschlecht	weiblich	202	1			
	männlich	202	1,06	0,67; 1,69	0,25	0,802
BCG- Impfung	nein	149	1			
	unbekannt	198	0,91	0,56; 1,48	0,23	0,703
	ja	57	1,46	0,70; 3,04	0,55	0,313
Immigrant	nein	359	1			
	ja	45	1,35	0,63; 2,88	0,52	0,436
Diabetes	nein	334	1			
	ja	70	1,55	0,82; 2,92	0,50	0,173

		Total n	Odds Ratio	95 % Konfidenz- Intervall	Standard Fehler	p-Wert
Ethnie	afroameri- kanisch	3	1			
	asiatisch	2	1,03	0,24; 44,26	1,98	0,988
	kau- kasisch	397	1,49	0,11; 20,17	1,98	0,765
	spanisch	1	1			
	unbekannt	1	1			
Raucher	nein	206	1	1		
	ja	198	1,43	0,90; 2,28	0,34	0,079
Gesamt		404				
ELISA unschlüssige Ergebnisse inkludiert, unbekannter Diabetes-, Immigranten- und Raucherstatus exkludiert, Pseudo R2=0,0870, log likelihood= -233,06437						

Tabelle 14. Logistische Regression für ELISA-Ergebnisse (QuantiFERON-TB Gold Plus)

		Total n	Odds Ratio	95 % Konfidenz-Intervall	Standard Fehler	p-Wert
Patienten- gruppen	Kontrollen	83	1			
	CRF	78	1,08	0,40; 2,97	0,56	0,875
	RA	89	0,31	0,88; 1,1	0,2	0,067
	SOTR	71	0,67	0,22; 1,97	0,37	0,471
	SCTR	78	0,29	0,08; 1	0,18	0,050
Geschlecht	weiblich	198	1			
	männlich	201	2,4	1,13; 5,09	0,92	0,022
BCG- Impfung	nein	147	1			
	unbekannt	196	1,94	0,91; 4,1	0,75	0,087
	ja	56	0,19	0,23; 1,61	0,21	0,128
Immigrant	nein	355	1			
	ja	44	1,86	0,63; 5,45	1,02	0,258
Diabetes	nein	330	1			
	ja	69	1,01	0,41; 2,47	0,46	0,906

		Total n	Odds Ratio	95 % Konfidenz-Intervall	Standard Fehler	p-Wert
Ethnie	afroamerikanisch	3	1			
	asiatisch	2	2,08	0,43; 100,96	4,12	0,711
	kaukasisch	392	0,26	0,02; 4,2	0,37	0,341
	spanisch	1	1			
	unbekannt	1	1			
Raucher	nein	204	1			
	ja	195	1,056123	0,52; 2,16	0,39	0,881
Gesamt		399				
ELISA unschlüssige Ergebnisse, unbekannter Diabetes-, Immigranten- und Raucherstatus exkludiert, Pseudo R ² =0,1152, log likelihood= -116,89569						

4.5 Differenz des TB-2- und TB-1-Röhrchens

Bei den meisten Patienten mit LTBI lag die Differenz des TB-2- und TB-1-Röhrchens zwischen 0 IU/ml und 0,6 IU/ml. In der Gruppe der aTB bewegte sich die Mehrheit der Ergebnisse in der Nähe dieses Grenzwertes. Im Kollektiv der Patienten mit LTBI wiesen zehn von insgesamt 43 positiven Probanden (23,3 %) eine IFN- γ -Antwort mit einer Differenz $> 0,6$ IU/ml auf, in der Gruppe der aTB hingegen vier von elf Patienten (36,4 %). Im Gegensatz dazu ergab sich bei 15 Personen mit LTBI und vier aTB eine negative Differenz zwischen dem TB-2- und TB-1-Röhrchen.

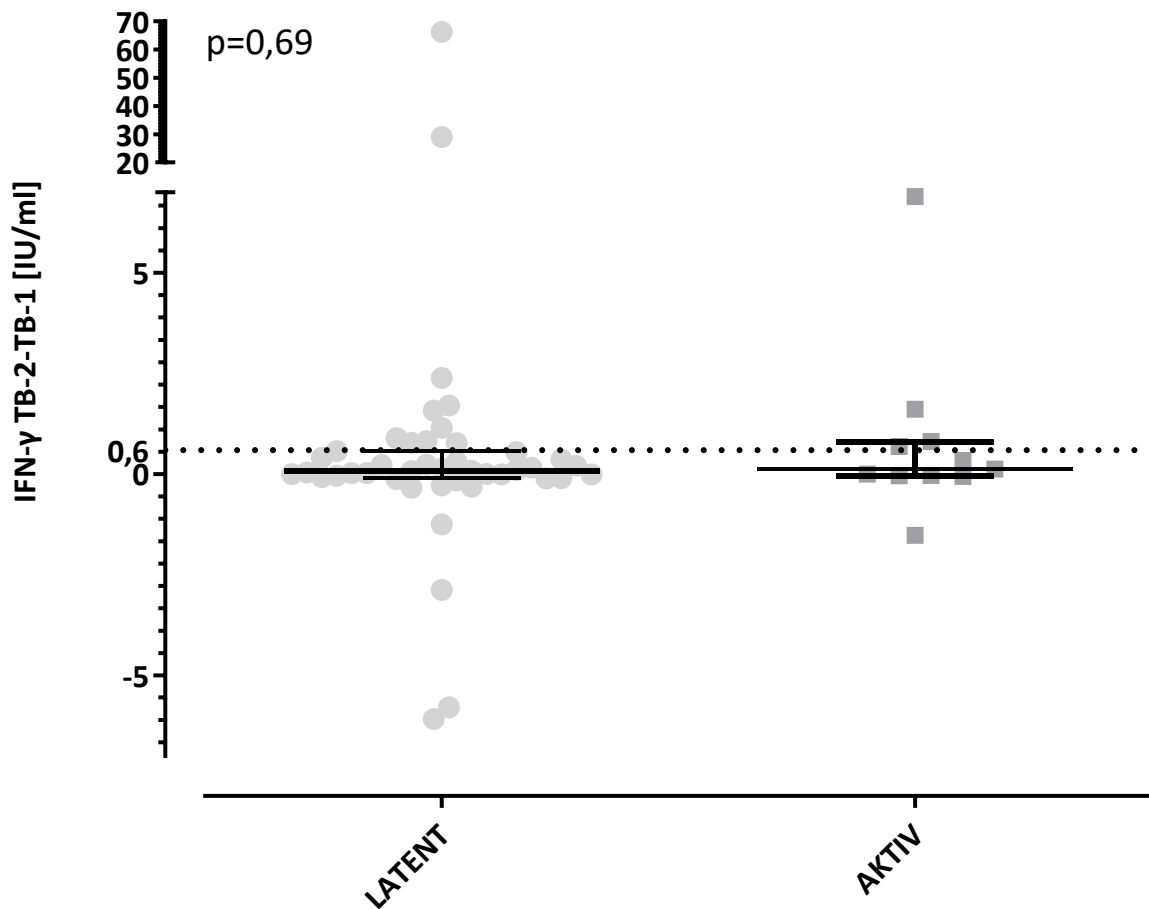


Abbildung 12. Differenz des TB-2- und TB-1-Röhrchens in den Personengruppen mit latenter (n=43) und aktiver (n=11) Tuberkuloseinfektion. Es wird postuliert, dass ein Unterschied von $> 0,6$ IU/ml eine klinisch relevante Differenz darstellt [116, 117], weshalb dieser Wert als gestrichelte Linie hervorgehoben wird. Der p-Wert wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Balken repräsentieren den Median und den IQR.

4.6 Sensitivität, Spezifität und positiv prädiktiver Wert

In dieser Arbeit ergab sich anhand der Kontrollkollektive sowie der aTB eine Spezifität des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests von 94,5 % und eine Gesamtsensitivität von 90,9 %. Bei der Unterteilung des Tests in die einzelnen Röhrchen ergab sich für die Spezifität kein Unterschied. Es zeigte sich eine Sensitivität von 81,8 % für das TB-1-Röhrchen und eine von 72,7 % für das TB-2-Röhrchen. Ein Patient mit Kultur-positiver aktiver Tuberkulose wurde weder durch das TB-1- noch durch das TB-2-Röhrchen erkannt. Zusätzlich zu diesem Patienten stufte das TB-1-Röhrchen einen Probanden als falsch-negativ ein und das TB-2-Röhrchen noch zwei weitere. Der in dieser Arbeit ermittelte positiv prädiktive Wert des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests für eine aktive Tuberkuloseerkrankung betrug 28,6 %. Bei der alleinigen Betrachtung der Menschen mit einer LTBI, die im Verlauf an einer aktiven Tuberkulose erkrankten, ergab sich anhand des zweijährigen *Follow-up*

ein positiv prädiktiver Wert von 0 %, da niemand aus dieser Gruppe eine aktive Tuberkulose entwickelte.

4.7 Charakterisierung der reaktiven T-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Eine durchflusszytometrische Untersuchung wurde zur genauen Evaluation der reagierenden Zellen bei 50 Probanden, die in Kapitel 3.1 genauer beschrieben werden, durchgeführt. Hierbei wurde neben PPD und den Peptidgemischen des TB-1- und TB-2-Röhrchens zudem mit ESAT-6 und CFP-10 Proteinen sowie mit SEB/SEE als Positivkontrolle stimuliert.

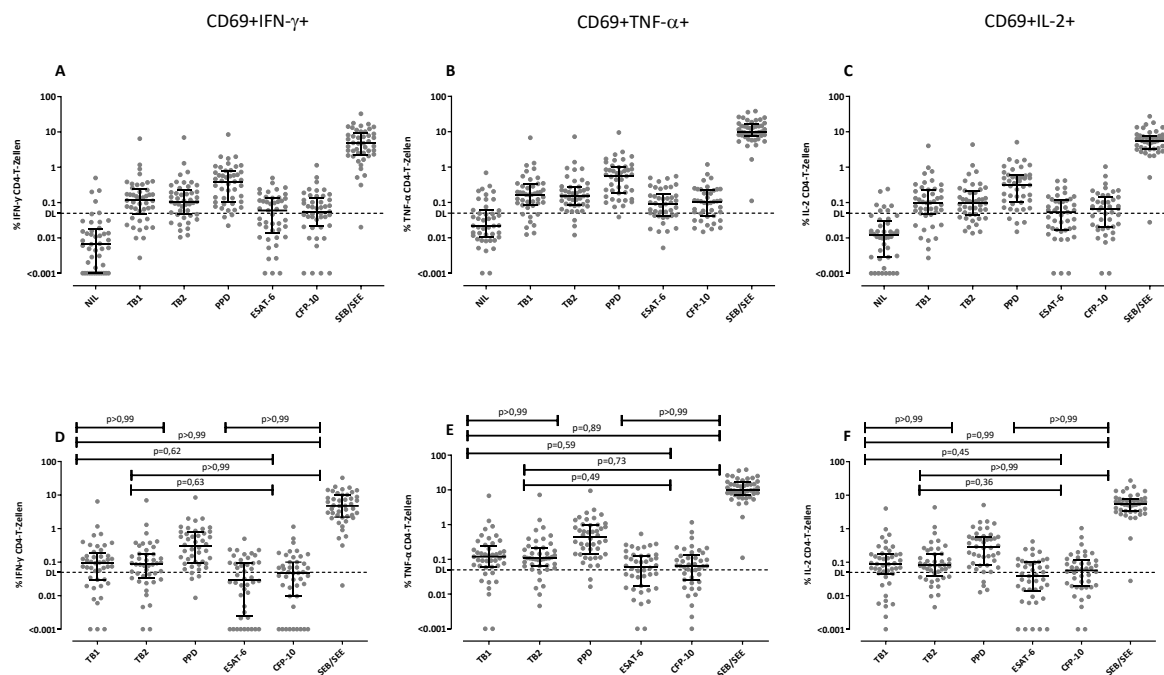


Abbildung 13. Prozentuale Anteile der reaktiven CD4-T-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung. Es wurden nur Patienten mit positivem QuantiFERON-TB Gold Plus Test eingeschlossen (n=44). Gezeigt werden die prozentualen Anteile der reaktiven CD4-T-Zellen, basierend auf der Co-Expression des Aktivierungsmarkers CD69 mit den Zytokinen IFN- γ (A, D), TNF- α (B, E) und IL-2 (C, F), die auf die Stimuli NIL, TB-1, TB-2, PPD, ESAT-6, CFP-10 und SEB/SEE reagieren. Panel A, B und C zeigen die gemessenen Ergebnisse, Panel D, E und F die normierten Werte nach Abzug der Negativkontrolle (NIL). Die gestrichelte Linie stellt das DL bei 0,05 % dar. Zur statistischen Auswertung wurde der Kruskal-Wallis-Test sowie der *Dunn's Multiple Comparison Test* verwendet. Balken repräsentieren den Median und den IQR.

Die Daten aus den durchflusszytometrischen Messungen zeigten den prozentualen Anteil der reagierenden CD4-T-Zellen, die alle auch CD69 positiv waren und zudem entweder IFN- γ , TNF- α oder IL-2 exprimierten. Der Oberflächenrezeptor CD69 diente dabei als früher Aktivierungsmarker. Von den gemessenen Werten (Abbildung 13 A, B, C) musste der Wert der Negativkontrolle subtrahiert werden, um die reinen Reaktivitäten auf die Stimuli zu erhalten (Abbildung 13 D, E, F). In jedem Panel war die Reaktivität in den Positivkontrollen SEB/SEE signifikant am stärksten ($p<0,0001$), wobei ein

Dialysepatient auf SEB/SEE unterhalb des DLs reagierte. Die Stimuli TB-1, TB-2, ESAT-6 und CFP-10 zeigten eine signifikant geringere Reaktivität der T-Zellen im Hinblick auf alle drei Zytokine im Vergleich zu PPD. Beim Vergleich der Stimulationen mit TB-1 und TB-2 waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar ($p > 0,99$), unabhängig davon, welches Zytokin betrachtet wurde. Im Median reagierten 0,033 % IFN- γ -produzierende-CD69-positive-CD4-T-Zellen auf das Antigen ESAT-6 und 0,049 % auf das Antigen CFP-10. Die Reaktivität auf CFP-10 war im Median höher als auf ESAT-6, der Unterschied verhielt sich jedoch bei jedem betrachteten Zytokin ohne statistische Signifikanz ($p > 0,99$). Ebenso war der prozentuale Anteil an reaktiven T-Zellen nach Stimulationen mit ESAT-6 und CFP-10 im Median geringer als nach Stimulation mit der Kombination der beiden Antigene in den TB-1- und TB-2-Röhrchen. Dennoch zeigte sich dieses Ergebnis ebenfalls ohne statistische Signifikanz.

Im Vergleich sind im Folgenden die prozentualen Anteile der reaktiven CD8-CD69-positiven-T-Zellen mit den drei Zytokinen dargestellt (Abbildung 14).

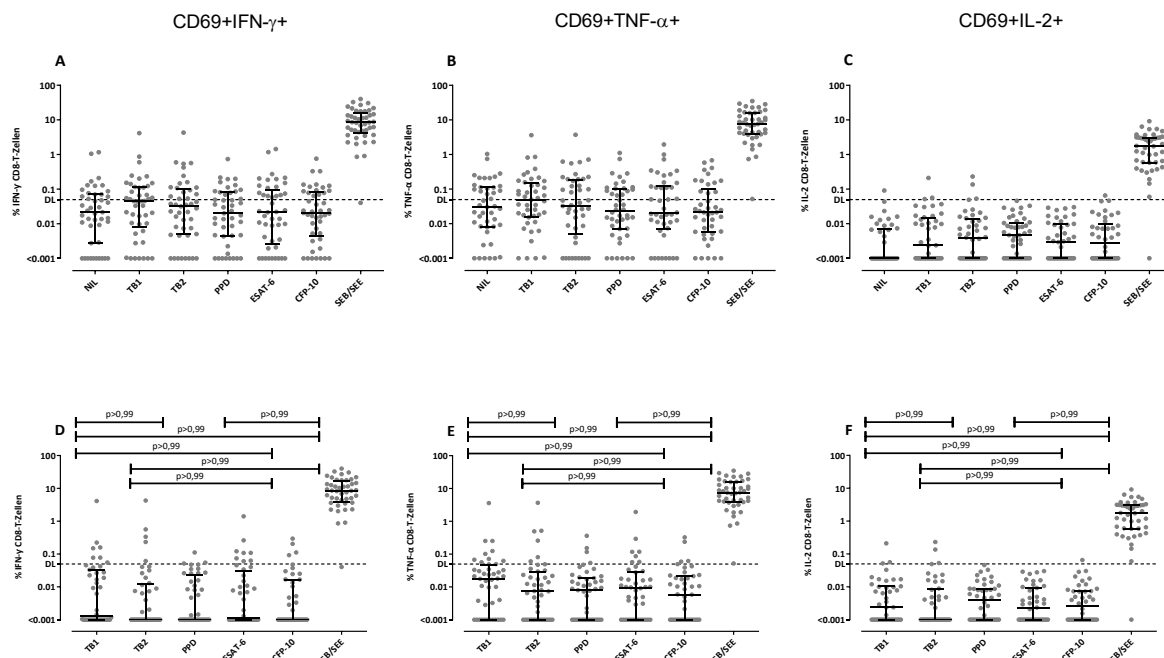


Abbildung 14. Prozentuale Anteile der reaktiven CD8-T-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung. Es wurden nur Patienten mit positivem QuantiFERON-TB Gold Plus Test eingeschlossen ($n=44$). Gezeigt werden die prozentualen Anteile der reaktiven CD8-T-Zellen, basierend auf der Co-Expression des Aktivierungsmarkers CD69 mit den Zytokinen IFN- γ (A, D), TNF- α (B, E) und IL-2 (C, F), die auf die Stimuli NIL, TB-1, TB-2, PPD, ESAT-6, CFP-10 und SEB/SEE reagieren. Panel A, B und C zeigen die gemessenen Ergebnisse, Panel D, E und F die normierten Werte nach Abzug der Negativkontrolle. Die gestrichelte Linie stellt das DL bei 0,05 % dar. Zur statistischen Auswertung wurde der Kruskal-Wallis-Test sowie der *Dunn's Multiple Comparison Test* verwendet. Balken repräsentieren den Median und den IQR.

Insgesamt stellte sich der prozentuale Anteil der CD8-T-Zellantwort schwächer dar als der prozentuale Anteil der CD4-T-Zellen. Die Reaktivität in der Positivkontrolle SEB/SEE war wie schon bei den CD4-

T-Zellen in allen Panels und im Vergleich zu allen Antigenen signifikant am stärksten ($p < 0,0001$). Es ließen sich keine weiteren signifikanten Unterschiede feststellen. Derselbe Dialysepatient, der mit seiner CD4-T-Zellreaktivität auf die Positivkontrolle unterhalb des DLs reagierte, zeigte hier ebenfalls keine ausreichende Reaktivität.

Im QuantiFERON-TB Gold Plus Test ließ sich im Vergleich zur Durchflusszytometrie zwar die IFN- γ Produktion, nicht aber die reagierenden Zellen genauer quantifizieren. Zur besseren Vergleichbarkeit der Verfahren wurde daher im Folgenden die Summe der reaktiven IFN- γ -produzierenden CD4- und CD8-T-Zellen gebildet und durch die Summe der Gesamt-CD4- und CD8-T-Zellen dividiert. Ein Vergleich der Stimuli TB-1, TB-2, ESAT-6 und CFP-10 sowie der Summe aus ESAT-6 und CFP-10 ist in Abbildung 15 dargestellt.

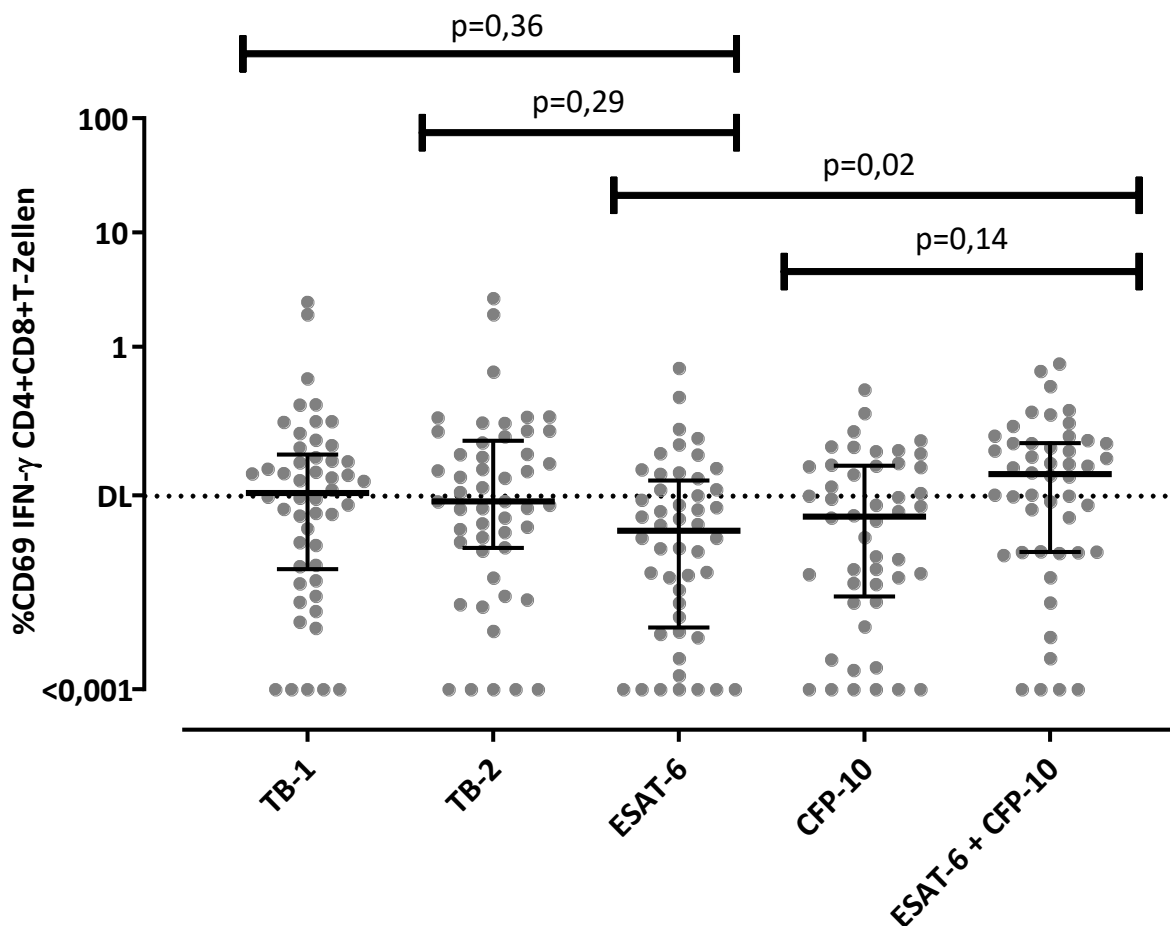


Abbildung 15. Vergleich der reaktiven CD4- und CD8-T-Zellantworten auf die verschiedenen Stimuli. Die dargestellten Werte der y-Achse wurden berechnet, indem man die Summe der reaktiven CD4- und CD8-T-Zellen durch die Summe der Gesamt-CD4-CD8-T-Zellen dividierte ($n=50$ bei TB-1 und TB-2 und $n=48$ bei ESAT-6 und CFP-10). Dies diente der Vergleichbarkeit mit dem QuantiFERON-TB Gold Plus Test, da dort bei der IFN- γ -Produktion nicht zwischen CD4- und CD8-T-Zellen unterschieden werden kann. Die gestrichelte Linie stellt das DL bei 0,05 % dar. Zur statistischen Auswertung wurde

der Kruskal-Wallis-Test sowie der *Dunn's Multiple Comparison Test* verwendet. Die nicht aufgeführten p-Werte sind alle $>0,99$ und wurden zur besseren Übersicht nicht dargestellt. Balken repräsentieren den Median und den IQR.

Ebenso wie beim getrennten Vergleich der CD4- und CD8-T-Zellen ergab sich auch bei deren Summe kein statistisch signifikanter Unterschied in Bezug auf die einzelnen Stimuli. Der einzig signifikante Unterschied zeigte sich erwartungsgemäß auf die Summe der Stimuli ESAT-6 und CFP-10 im Vergleich zum alleinigen Stimulus mit ESAT-6 ($p=0,02$). Die T-Zellen im TB-1-Röhrchen reagierten ohne signifikante Unterschiede zu den T-Zellen des TB-2-Röhrchens ($p>0,99$). Des Weiteren zeigte sich eine statistische Vergleichbarkeit der Reaktionen auf die Antigene im TB-1- und TB-2-Röhrchen mit der Summe aus ESAT-6 und CFP-10 ($p>0,99$).

4.7.1 Korrelation Durchflusszytometrie und QuantiFERON-TB Gold Plus Test

Um die Frage beantworten zu können, ob die prozentualen Anteile der mittels Durchflusszytometrie gemessenen T-Zellen mit der Höhe der IFN- γ Sekretion im QuantiFERON-TB Gold Plus Test miteinander korrelieren und bei welchen Stimuli die Korrelation am stärksten ist, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt.

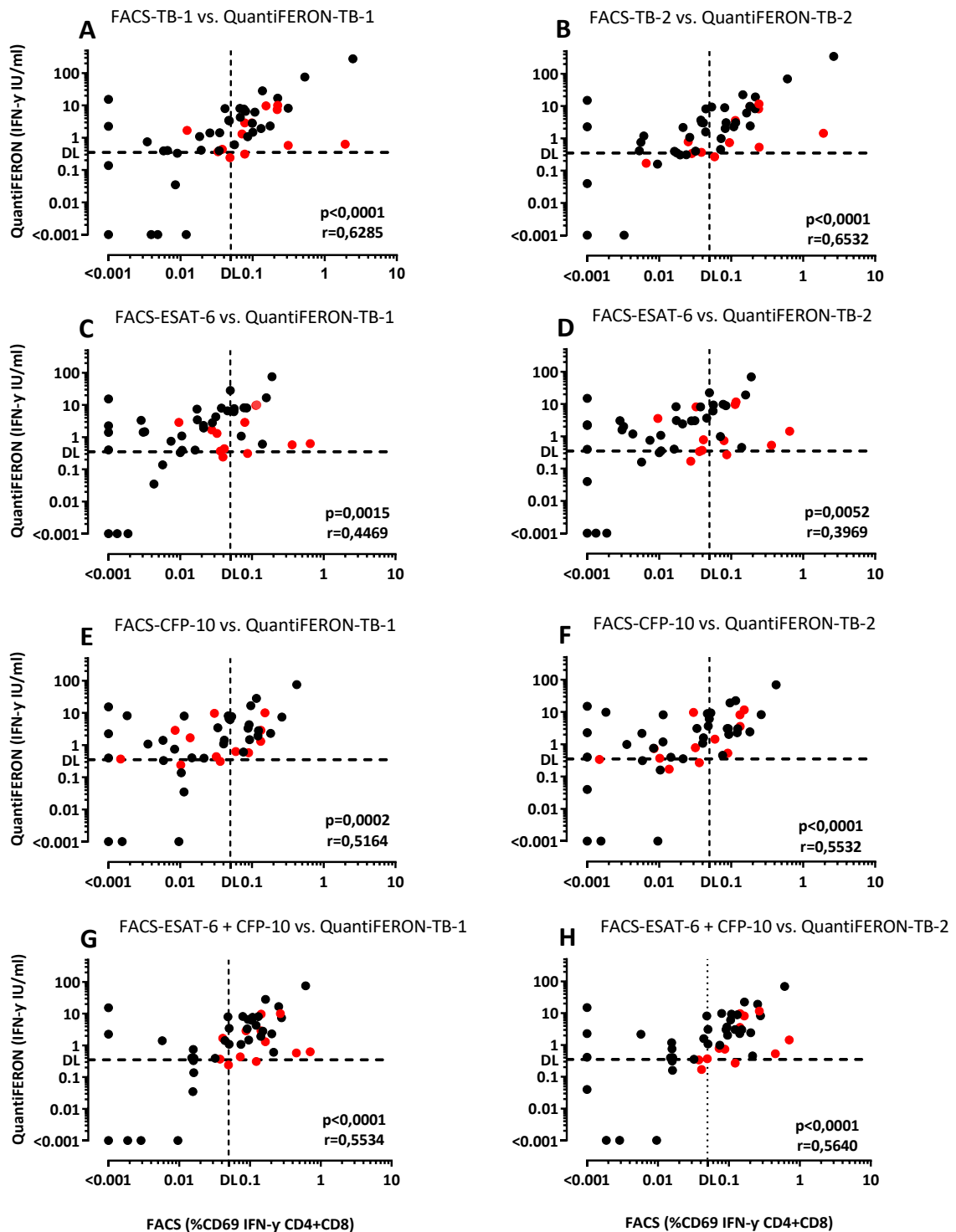


Abbildung 16. Korrelationen zwischen den verschiedenen Stimuli der FACS-Analyse und dem QuantiFERON-TB Gold Plus Test. Die Werte der x-Achse wurden berechnet, indem man die Summe der reaktiven CD4- und CD8-T-Zellen durch die Summe der Gesamt-CD4-CD8-T-Zellen dividierte (n=50 bei TB-1 und TB-2 und n=48 bei ESAT-6 und CFP-10). Dies diente der Vergleichbarkeit mit dem QuantiFERON-TB Gold Plus Test, da dort die IFN- γ -Produktion sowohl durch CD4- als auch CD8-T-Zellen erfolgt. Die p- und r-Werte wurden mit dem Spearman-Korrelationstest berechnet. Auf der y-Achse sind die Werte des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests dargestellt. Die rote Markierung zeigt Proben von aTB. Die gestrichelten Linien markieren die DLs des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests bei 0,35 IU/ml und der Durchflusszytometrie bei 0,05 %.

Die kombinierten Anteile reaktiver (CD69- und IFN- γ -positiver) CD4- und CD8-T-Zellen aus den durchflusszytometrischen Analysen wurden mit den IFN- γ -Werten des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests jeweils für die verschiedenen Stimuli verglichen. Neben der signifikanten Korrelation ($p < 0,0001$, $r = 0,6285$) von TB-1 in der FACS-Analyse und dem QuantiFERON-TB Gold Plus Test (Abbildung 16 A) zeigte sich auch eine signifikante Korrelation beim Vergleich von TB-2 zwischen beiden Testverfahren ($p < 0,0001$, $r = 0,6532$, Abbildung 16 B). Da sich die im QuantiFERON-TB Gold Plus Test verwendeten Antigene in den Röhren TB-1 und TB-2 aus unterschiedlichen Kombinationen von Peptiden der Antigene ESAT-6 und CFP-10 zusammensetzen, wurden die Ergebnisse der QuantiFERON-Röhren außerdem mit den durchflusszytometrisch detektierten Antworten auf die einzelnen Antigene ESAT-6 bzw. CFP-10 und deren Summe korreliert. Die stärkste Korrelation ($p < 0,0001$, $r = 0,5640$, Abbildung 16 H) zeigte sich dabei zwischen der Summe aus ESAT-6 und CFP-10 (FACS) und TB-2 (QFT-Plus), dem Antigengemisch, das zusätzlich kleinere MHC-Klasse I bindende CFP-10 Peptidfragmente enthält. Die schwächste, aber dennoch eine signifikante Korrelation ($p < 0,0052$, $r = 0,3969$, Abbildung 16 D), stellte sich hingegen für das in der FACS-Analyse verwendete ESAT-6 Antigen und das TB-2-Röhrchen (QFT-Plus) ein.

Neben der direkten Korrelationsanalyse der quantitativen Werte lassen sich auch die qualitativen Testergebnisse miteinander vergleichen. Einerseits wurden die qualitativen QuantiFERON-TB Gold Plus Ergebnisse inklusive der aTB im Vergleich zu den Ergebnissen der durchflusszytometrisch evaluierten Antworten im TB-1- und TB-2-Röhrchen sowie in beiden zusammen betrachtet. Andererseits wurden die qualitativen QuantiFERON-TB Gold Plus Ergebnisse mit der durchflusszytometrisch gemessenen Summe aus reaktiven T-Zellen gegen ESAT-6 und CFP-10 verglichen. Als Nachweisgrenze für eine positive Reaktion dienten 0,35 IU/ml für den QuantiFERON-TB Gold Plus Test und 0,05 % für die Durchflusszytometrie. Die Auswertung erfolgte jeweils mit dem Chi-Quadrat-Test.

Tabelle 15. Vierfeldertafel der QuantiFERON-TB Gold Plus Ergebnisse im Vergleich zu den durchflusszytometrischen TB-1- und TB-2-Ergebnissen

	TB-1 und/oder TB-2 positiv	TB-1 und TB-2 negativ
QuantiFERON positiv	25	18
QuantiFERON negativ	1	6

p = 0,0313

Tabelle 16. Vierfeldertafel der QuantiFERON-TB Gold Plus Ergebnisse im Vergleich zu den durchflusszytometrischen Ergebnissen der Summe aus ESAT-6 und CFP-10

	ESAT-6 + CFP-10 positiv	ESAT-6 + CFP-10 negativ
QuantiFERON positiv	27	14
QuantiFERON negativ	1	6

p=0,0105

Tabelle 17. Vierfeldertafel der durchflusszytometrischen TB-1-Ergebnisse im Vergleich zur Summe aus ESAT-6 und CFP-10

	ESAT-6 + CFP-10 positiv	ESAT-6 + CFP-10 negativ
TB-1 positiv	24	0
TB-1 negativ	4	20

p<0,0001

Tabelle 18. Vierfeldertafel der durchflusszytometrischen TB-2-Ergebnisse im Vergleich zur Summe aus ESAT-6 und CFP-10

	ESAT-6 + CFP-10 positiv	ESAT-6 + CFP-10 negativ
TB-2 positiv	23	0
TB-2 negativ	5	20

p<0,0001

Tabelle 19. Vierfeldertafel der durchflusszytometrischen TB-1- und TB-2-Ergebnisse im Vergleich zur Summe aus ESAT-6 und CFP-10

	ESAT-6 + CFP-10 positiv	ESAT-6 + CFP-10 negativ
TB-1 und/oder TB-2 positiv	24	0
TB-1 und TB-2 negativ	3	21

p<0,0001

Insgesamt zeigt sich jeweils eine signifikante Übereinstimmung der Testergebnisse, wodurch die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen diagnostischen Möglichkeiten zusätzlich bestätigt wird.

4.7.2 Stimulationsspezifische durchflusszytometrische Auswertung innerhalb der Probandengruppen

Im Folgenden werden die durch die Durchflusszytometrie ermittelten prozentualen Anteile reaktiver T-Zellen der einzelnen Probandengruppen miteinander verglichen. Dabei wurden die Patienten mit einem positiven QuantiFERON-TB Gold Plus Test und die aTB in die Analyse eingeschlossen (Abbildung 17).

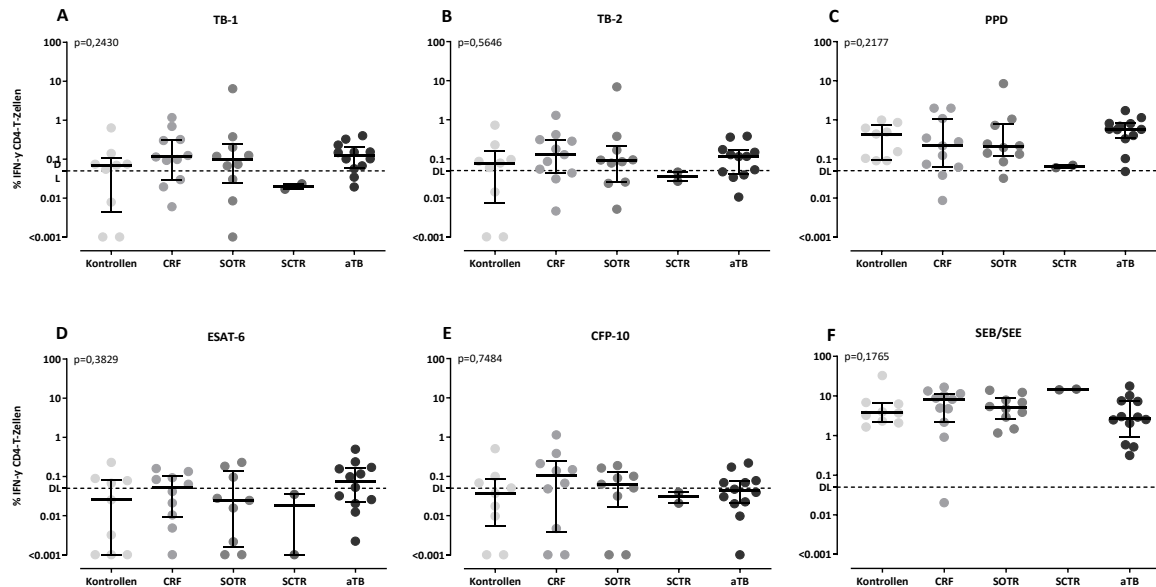


Abbildung 17. Vergleich der prozentualen Anteile der reaktiven CD4-IFN- γ -T-Zellen auf verschiedene Stimuli bei Patienten mit positivem QuantiFERON-TB Gold Plus Test. Es wurden QuantiFERON-TB Gold Plus Test positive Patienten und alle aTB für die Auswertung herangezogen. Panel A bis F zeigen die prozentualen Anteile der reaktiven CD4-T-Zellen auf die unterschiedlichen Stimuli TB-1, TB-2, PPD, ESAT-6, CFP-10 und SEB/SEE in den einzelnen Patientengruppen (n=44 bei TB-1, TB-2, PPD und SEB/SEE, n=42 bei ESAT-6 und CFP-10). P-Werte wurden durch den Kruskal-Wallis-Test errechnet. Die gestrichelte Linie stellt das DL von 0,05 % dar. Balken repräsentieren den Median und den IQR.

Die prozentualen Anteile der reaktiven CD69-CD4-positiven-T-Zellen der verschiedenen Probandengruppen zeigten auf keinen der verwendeten Stimuli einen signifikanten Unterschied (Abbildung 17). Die Frequenzen der reaktiven CD4-T-Zellen auf TB-1 und TB-2 lagen im Vergleich zu den einzelnen Antigenen ESAT-6 und CFP-10 erwartungsgemäß höher, wohingegen die Frequenzen erwartungsgemäß auf PPD und SEB/SEE die höchsten Werte in den einzelnen Kollektiven aufwiesen. Als einzige Gruppe mit reaktiven CD4-T-Zellen unterhalb des DLs auf die Stimuli TB-1 (Median: 0,02 %) und TB-2 (Median: 0,036 %) zeigten sich die SCTR. Bei den Antigenen PPD, ESAT-6 und CFP-10 war die Reaktion dieser Patientengruppe im Median am geringsten, wohingegen diese bei SEB/SEE mit einem Median von 14,53 % am stärksten reagierte.

Die durchflusszytometrischen Ergebnisse stimmten für das TB-1-Röhrchen mit den qualitativen Gesamtergebnissen des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests bei sechs Kontrollen, acht CRF, sieben SOTR und zehn aTB überein (Tabelle 15 und Abbildung 17). Die Anzahl an positiven und negativen Testergebnissen der Probanden auf den Stimulus TB-1 und TB-2 stimmte in allen Gruppen außer der Gruppe der aTB überein. Zwei aTB reagierten nach Stimulation mit TB-1 Peptiden in der FACS-Analyse unterhalb des DLs, wohingegen dies für vier Probanden nach Stimulation mit TB-2 zutraf. Der aktive Tuberkulosepatient, der anhand des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests als negativ eingestuft wurde, zeigte im Gegensatz dazu ein positives FACS-Ergebnis. Bei der alleinigen Betrachtung der Stimulation mit ESAT-6 und CFP-10 in der FACS-Auswertung ließen sich weniger Menschen mit LTBI nachweisen. Durch beide Antigene wurden jeweils vier Kontrollpersonen als Probanden mit LTBI deklariert. ESAT-6 hingegen erfasste weiterhin fünf CRF, drei SOTR und sieben aTB als positiv getestete Personen, wohingegen CFP-10 zusätzlich zwei Patienten mehr als Probanden mit LTBI einstuft. Von den Menschen mit Frequenzen oberhalb des DLs waren sechs CRF, sechs SOTR und fünf aTB. Im Folgenden werden die gleichen Auswertungen für die CD69-CD8-positiven-T-Zellen gezeigt (Abbildung 18).

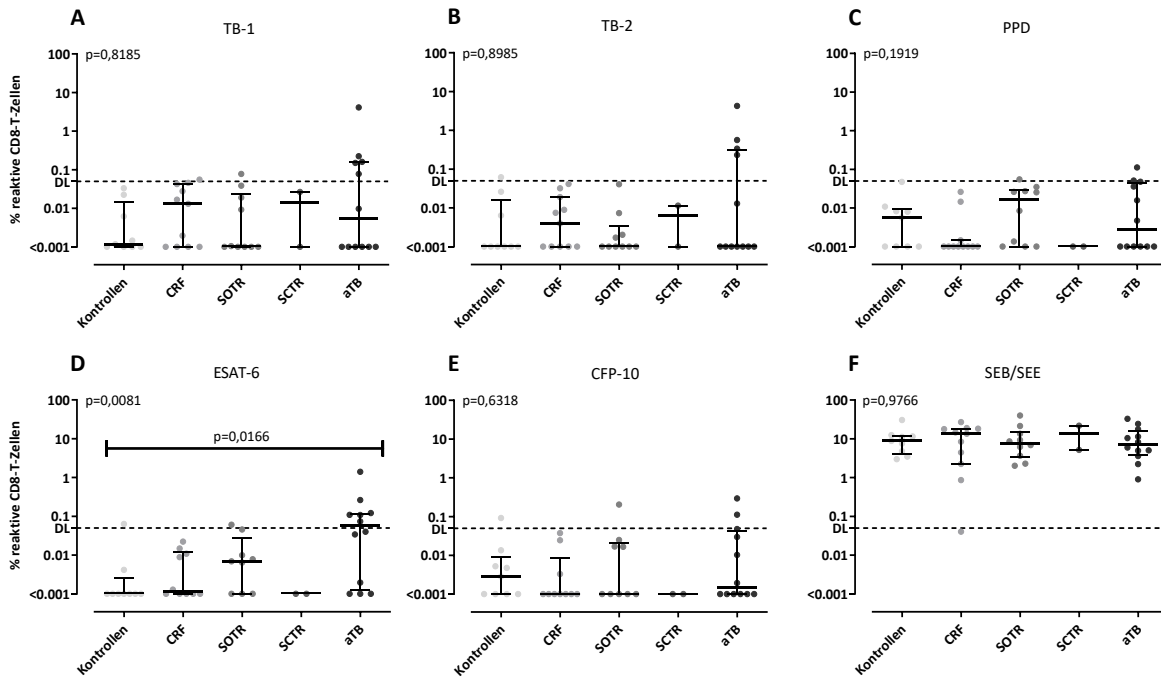


Abbildung 18. Vergleich der prozentualen Anteile der reaktiven CD8-IFN- γ -T-Zellen auf verschiedene Stimuli bei Patienten mit positivem QuantiFERON-TB Gold Plus Test. Es wurden nur QuantiFERON-TB Gold Plus Test positive Patienten und alle aTB für die Auswertung herangezogen. Panel A bis F demonstrieren die prozentualen Anteile der reaktiven CD8-T-Zellantworten auf die unterschiedlichen Stimuli TB-1, TB-2, PPD, ESAT-6, CFP-10 und SEB/SEE in den verschiedenen Patientengruppen (n=44 bei TB-1, TB-2, PPD und SEB/SEE, n=42 bei ESAT-6 und CFP-10). P-Werte wurden durch den Kruskal-Wallis-Test errechnet. Die gestrichelte Linie stellt das DL von 0,05 % dar. Balken repräsentieren den Median und den IQR.

Insgesamt waren die prozentualen Anteile der reaktiven CD8-T-Zellantworten im Median geringer im Vergleich zu den prozentualen Anteilen der reaktiven CD4-T-Zellantworten (Abbildung 17), mit Ausnahme des Stimulus SEB/SEE, auf den sie ähnlich stark reagierten. In den Panels gab es keine signifikanten Unterschiede innerhalb der reaktiven CD8-T-Zellantworten zwischen den einzelnen Gruppen, mit Ausnahme des statistisch signifikanten Unterschieds der Kontrollgruppen und den aTB auf das Antigen ESAT-6 ($p=0,0166$). Im Kollektiv der SOTR, das lediglich aus zwei Probanden bestand, stellte sich ein sehr niedriges Reaktivitätsmuster auf die Stimulation mit PPD, ESAT-6 und CFP-10 dar. Würde man als alleinige diagnostische Basis die CD8-T-Zellantwort mit einem DL bei 0,05 % nutzen, so würden weniger Personen ein positives Testergebnis im Vergleich zur CD4-T-Zellantwort erzielen. Durch die Antigene des TB-1-Röhrchens würden anhand der FACS-Analyse nur ein Dialysepatient, ein Organtransplantierter und fünf aTB als positiv gewertet werden. Auf die TB-2-Antigene reagierten die CD8-T-Zellen von ausschließlich einer Kontrollperson und von vier aTB oberhalb des DLs. Im Gegensatz dazu wurden durch den Stimulus ESAT-6 und die darauf reagierenden CD8-T-Zellen sogar sechs aTB als solche erkannt, wohingegen dies auf das Antigen CFP-10 lediglich bei zwei Personen

zutraf. Beide Stimuli dienten mit ihren CD8-T-Zellreaktivitäten der Erkennung einer LTBI von jeweils einer Kontrollperson und einem Organtransplantierten. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der im vorherigen Abschnitt beschriebenen CD4-T-Zellen, dann stellt sich heraus, dass sowohl auf den Stimulus TB-1 als auch auf TB-2 mehr Menschen anhand ihrer CD4-T-Zellantwort als positiv erkannt wurden im Gegensatz zu ihrer CD8-T-Zellantwort. Des Weiteren zeigte sich eine stärkere Frequenz der reaktiven CD4-T-Zellen auf ESAT-6 und CFP-10 bei allen Patienten im Vergleich zur Frequenz der reaktiven CD8-T-Zellen. Bei der näheren Betrachtung der CD8-positiven-T-Zellen wurde deutlich, dass diese in der Gruppe der aTB öfter auf TB-1 reagierten als auf TB-2 und häufiger auf ESAT-6 als auf CFP-10 obwohl im TB-2-Röhrchen des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests vermehrt, kurze CFP-10 Peptide zur Stimulation von CD8-T-Zellen hinzugefügt wurden. Um weitere Unterschiede herausstellen zu können, wurden die Patienten im Folgenden anhand ihres QuantiFERON-TB Gold Plus Tests in die Kollektive negativ oder latent infiziert und anhand der direkten Nachweisverfahren in die Gruppe der aTB eingeteilt.

4.7.3 Stimulationsspezifische durchflusszytometrische Auswertung anhand des QuantiFERON-TB Gold Plus Testergebnisses

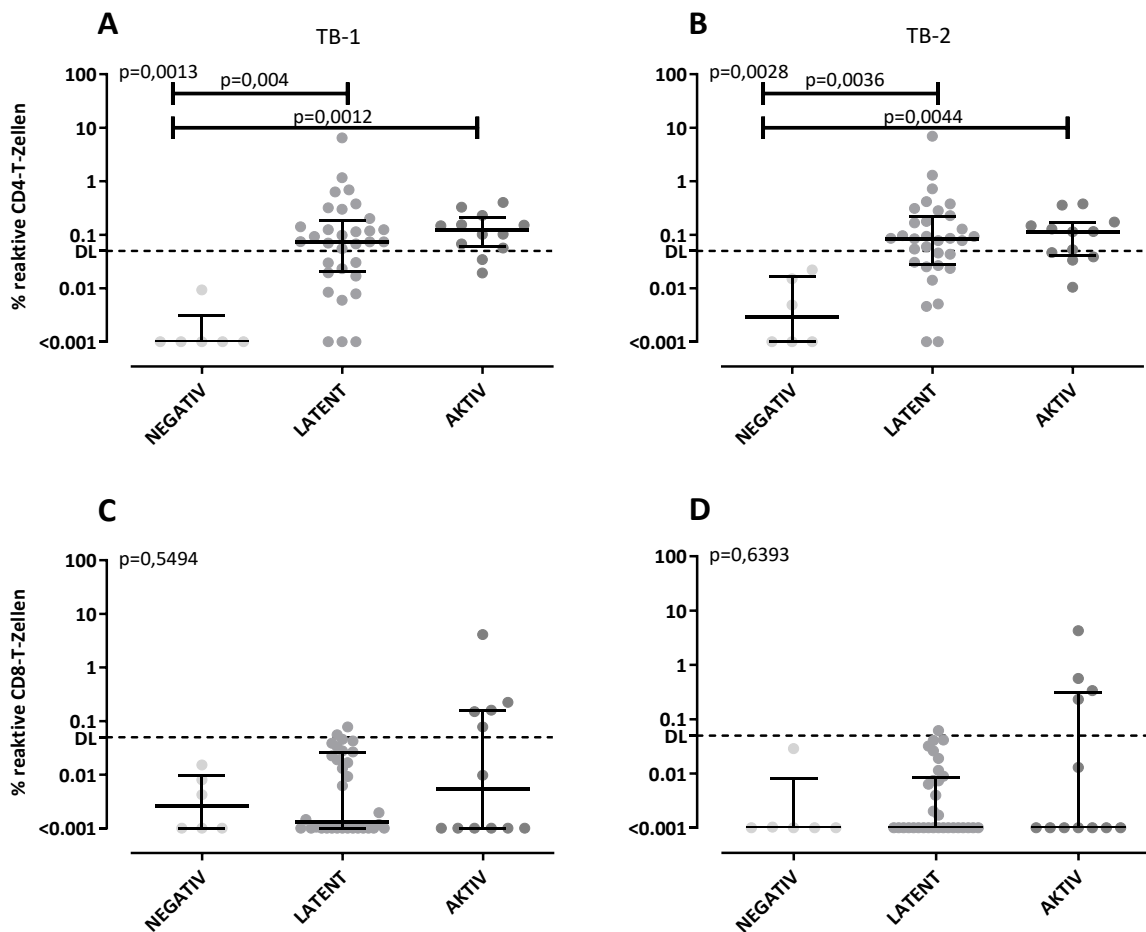


Abbildung 19. Vergleich der durchflusszytometrisch gemessenen IFN- γ -Antworten der prozentualen Anteile der reaktiven CD4- und CD8-T-Zellen auf die Stimuli TB-1 und TB-2 mit Einteilung der Patienten in die Gruppen der QuantiFERON-TB Gold Plus Test negativen und latenten Probanden sowie aTB. Die Einteilung der Patientengruppen (n=50) erfolgte aufgrund des Ergebnisses des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests in negative und latent infizierte Probanden. aTB wurden durch direkte Erregernachweisverfahren dieser Gruppe zugeteilt. P-Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test berechnet. Die gestrichelte Linie stellt das DL von 0,05 % dar. Balken repräsentieren den Median und den IQR.

Die Reaktivitätsmuster der CD69-CD4- und CD69-CD8-positiven-T-Zellen auf die Stimuli TB-1 und TB-2 wurden anhand des QuantiFERON-TB Gold Plus Testergebnisses bei negativen und latenten Probanden und anhand des direkten Erregernachweises bei aTB untersucht (Abbildung 19). Die reaktiven CD69-CD4-positiven-T-Zellen zeigten jeweils signifikante Unterschiede in den Frequenzen zwischen den negativen Patienten zu den anderen beiden Probandengruppen (Abbildung 19 A, B). Zwischen den latenten Studienteilnehmern und den aTB gab es bezüglich der Frequenzen allerdings keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich dazu reagierten die reaktiven CD8-T-Zellen auf die

Stimuli TB-1 und TB-2 nicht signifikant unterschiedlich in den einzelnen Gruppen. Der Median der aTB lag beim Stimulus TB-1 mit 0,005 % (Abbildung 19 C) zwar leicht höher als der Median des Stimulus TB-2 mit 0,0 % (Abbildung 19 D), aber dennoch deutlich unterhalb der für CD4-T-Zellen etablierten Nachweisgrenze von 0,05 %. Im Kollektiv der aTB zeigten sich bei fünf (Abbildung 19 C) bzw. vier Patienten (Abbildung 19 D) die prozentualen Anteile der reaktiven CD8-T-Zell-Antworten deutlich oberhalb des DLs. Die Reaktivitätsmuster der CD69-CD4- und CD69-CD8-positiven-T-Zellen auf die Antigene ESAT-6 und CFP-10 wird im Folgenden analysiert (Abbildung 20).

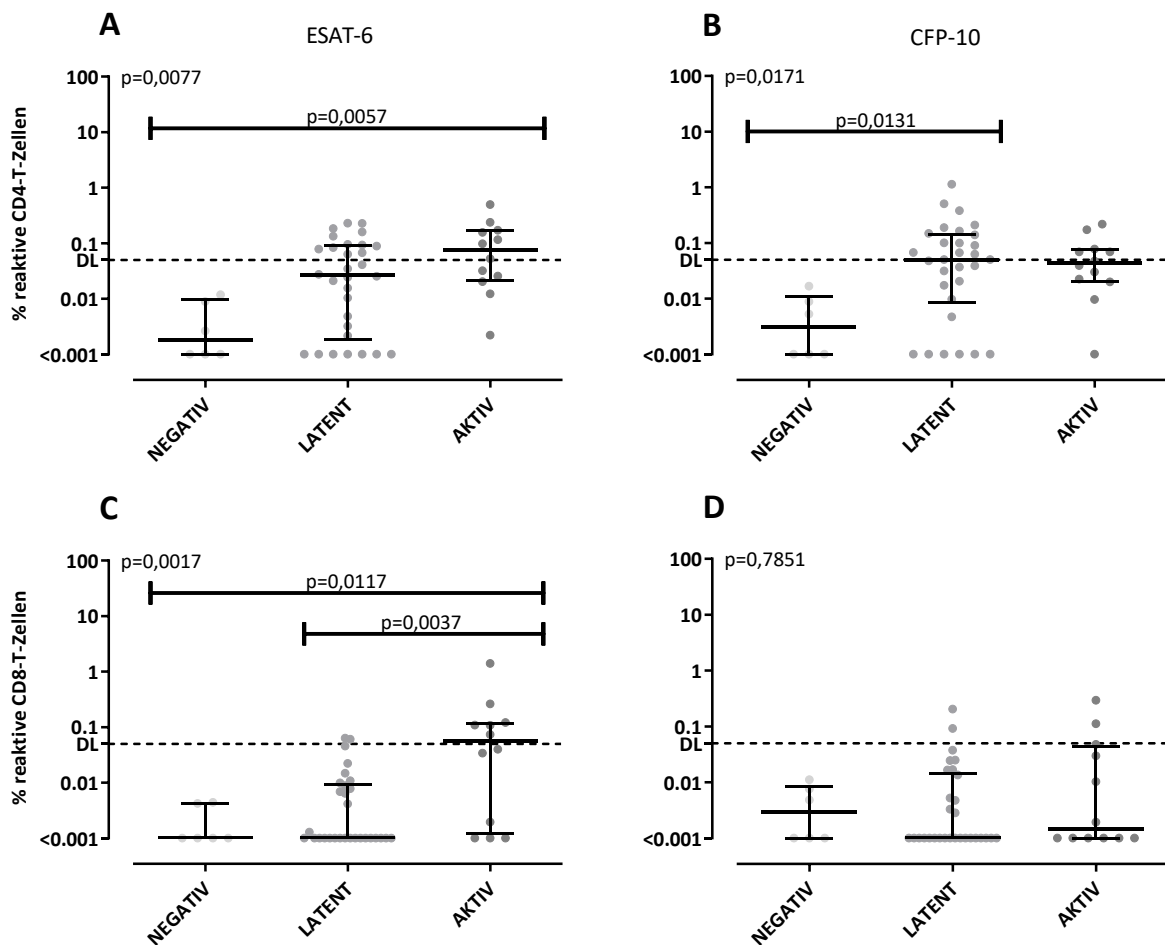


Abbildung 20. Vergleich der IFN- γ -Antworten der prozentualen Anteile der reaktiven CD4- und CD8-T-Zellen auf die Stimuli ESAT-6 und CFP-10 mit der Einteilung der Patienten in die Gruppen der QuantiFERON-TB Gold Plus Test negativen und latenten Probanden sowie aTB. Die Einteilung der Patientengruppen erfolgte aufgrund des Ergebnisses des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests in negative und latente Probanden. Die Probanden, die als aTB eingestuft wurden, wurden mithilfe von direkten Nachweisverfahren dieser Gruppe zugeteilt (n=48). P-Werte wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test berechnet. Die gestrichelte Linie stellt das DL von 0,05 % dar. Balken repräsentieren den Median und den IQR.

Auf den Stimulus ESAT-6 war der prozentuale Anteil der CD4-T-Zellen der negativen Probanden signifikant geringer ($p=0,0057$) als der der aTB. Zwischen den latenten Studienteilnehmern und den aTB stellte sich kein signifikanter Unterschied dar, ebenso gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den negativen und latenten Probanden in Bezug auf die CD4-T-Zell-Antwort. Es fiel auf, dass der Median der aTB mit einem Wert von 0,076 % oberhalb des DLs lag (Abbildung 20 A). Die Frequenz der aTB überstieg auch bei den CD8-T-Zellen auf die Stimulation mit ESAT-6 das DL (Abbildung 20 C). In Bezug auf das Antigen ESAT-6 ließen sich bei der Betrachtung der CD8-T-Zellen signifikante Unterschiede einerseits zwischen den aTB und den Probanden mit LTBI ($p=0,0037$) und andererseits den aTB und den Probanden mit negativem QuantiFERON-TB Gold Plus Test feststellen ($p=0,0117$, Abbildung 20 C). Im Gegensatz dazu ließen sich dabei zwischen den negativen und latenten Personen keine Unterschiede beobachten, sodass anhand dieses Parameters erstmalig eine Unterscheidung zwischen gesunden Menschen, Personen mit LTBI und aTB getroffen werden konnte. Bei der Betrachtung des Antigens CFP-10 fiel ein signifikanter Unterschied in den Frequenzen der reaktiven CD4-T-Zellen zwischen den negativen und latenten Personen auf ($p=0,0131$, Abbildung 20 B), jedoch nicht zwischen den Probanden mit einem negativen oder latenten QuantiFERON-TB Gold Plus Ergebnis und aTB. Im Vergleich dazu unterschied sich die Frequenz der reaktiven CD8-T-Zellen auf den Stimulus CFP-10 in den einzelnen Kollektiven nicht signifikant ($p=0,7851$, Abbildung 20 D). Neben den Unterschieden zwischen den einzelnen Probandengruppen wurden ebenso die interindividuellen Unterschiede der einzelnen Studienteilnehmer analysiert.

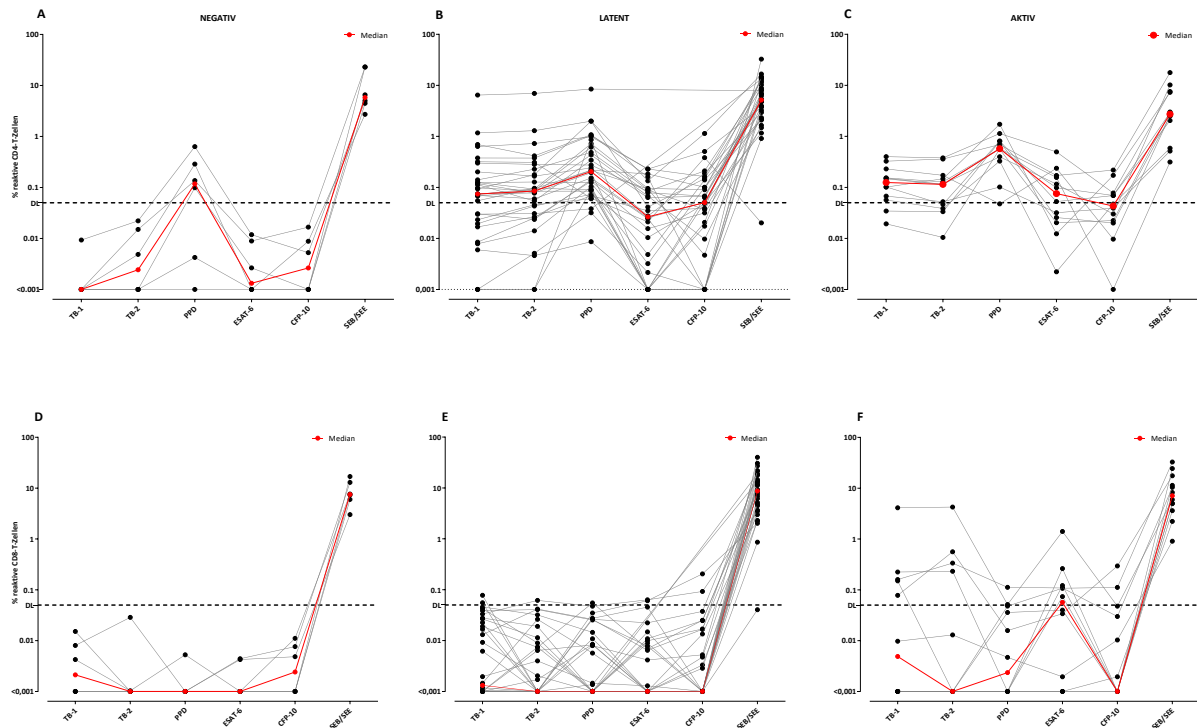


Abbildung 21. Interindividuelle Darstellung der reaktiven CD4- und CD8-T-Zell-Antworten der einzelnen Probanden auf die unterschiedlichen Stimuli. Die Einteilung der Patientengruppen erfolgte aufgrund des Ergebnisses des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests (n=50) in negative (Panel A, D) und latente Probanden (Panel B, E). Personen, die als aTB eingestuft wurden, wurden mithilfe von direkten Nachweisverfahren identifiziert (Panel C, F). Die verschiedenen Linien verbinden die Höhe der Reaktivität auf einen Stimulus für die jeweiligen Probanden miteinander. Die rote Linie repräsentiert den Median. Die gestrichelte Linie stellt das DL bei 0,05 % dar.

Alle Patienten mit negativem Testergebnis reagierten sowohl anhand ihrer CD4-, als auch anhand der CD8-T-Zellantworten stark in der Positivkontrolle und deutlich unterhalb des DLs auf die Stimuli TB-1, TB-2, ESAT-6 und CFP-10 (Abbildung 21 A, D). Die Probanden mit einer höheren CD4-T-Zellantwort auf die Stimulation mit TB-1 und TB-2 zeigten auch eine höhere ESAT-6 und CFP-10 T-Zellantwort. Bis auf zwei Personen reagierten die CD4-T-Zellen aller negativ getesteten Studienteilnehmer oberhalb des DLs auf das Antigen PPD (Abbildung 21 A). Die CD4-T-Zellantworten der Patienten mit positivem QuantiFERON-TB Gold Plus Ergebnis stellten sich insgesamt uneinheitlicher dar als die der negativ getesteten Studienteilnehmer. Dennoch ließ sich erkennen, dass bei der Mehrzahl der Personen die CD4-T-Zellen auf die Stimuli TB-1, TB-2, ESAT-6 und CFP-10 entweder einheitlich über dem DL oder einheitlich darunter reagierten. Bei den Menschen, die nur anhand ihrer Reaktion auf eines der Antigene ESAT-6 oder CFP-10 ein negatives Testresultat erzielen würden, befanden sich die Frequenzen dieser Antigene überwiegend im Bereich des DLs. Eine Ausnahme davon bildeten vier Patienten, bei denen jeweils eines der Antigene ESAT-6 (bei einer Person) oder CFP-10 (bei drei Personen) eine sehr schwache Reaktivität hervorrief. Im Gegensatz dazu löste das

jeweils andere Antigen sowie die Stimuli TB-1 und TB-2 eine sehr starke T-Zellantwort aus (Abbildung 21 B). Im Vergleich dazu würde sich bei der alleinigen Auswertung der Frequenzen der reaktiven CD8-T-Zellen, unter der Annahme des lediglich für CD4-T-Zellen etablierten und somit für CD8-T-Zellen hypothetischen DLs, bei fast allen als latent getesteten Probanden ein negatives Testergebnis einstellen. Zwei Studienteilnehmer bildeten davon eine Ausnahme. Einer zeigte eine Reaktivität auf die Stimuli TB-1 und ESAT-6 knapp oberhalb des hypothetischen DLs, wohingegen eine deutliche T-Zellantwort auf CFP-10 sichtbar wurde und die Antwort auf TB-2 negativ ausfiel. Bei einer anderen Person stellte sich auf das Antigen CFP-10 eine deutliche Reaktivität und auf die Stimuli ESAT-6 sowie TB-2 eine knapp oberhalb des DLs liegende CD8-T-Zellantwort ein, wohingegen die TB-1-Antwort unterhalb des DLs lag (Abbildung 21 E). Von den aTB reagierten in ihrer CD4-T-Zellantwort drei Patienten auf die Stimuli TB-1, TB-2, ESAT-6 und CFP-10 einheitlich positiv sowie zwei weitere einheitlich negativ. Die Frequenzen von drei Studienteilnehmern auf die verschiedenen Antigene stellte sich sehr uneinheitlich dar, wobei alle Werte bei diesen Personen um das hypothetische DL schwankten. Im Gegensatz dazu reagierten die CD4-T-Zellen von drei Probanden deutlich positiv auf alle Stimuli bis auf CFP-10, wohingegen der umgekehrte Fall, dass alle Stimuli bis auf ESAT-6 deutlich positiv waren, nur bei einem weiteren Studienteilnehmer auftrat (Abbildung 21 C). Ähnlich zur CD4-T-Zellantwort stellten sich die Resultate für die CD8-T-Zellantwort der aTB dar. Bei fünf Personen kam es zu einem einheitlich positiven oder negativen Befund auf die Stimuli TB-1, TB-2, ESAT-6 und CFP-10. Bei drei weiteren Studienteilnehmern ließ sich eine starke Reaktivität auf all diese Antigene bis auf CFP-10 erkennen. Ein Proband erzielte das gleiche Ergebnis jedoch auf die Stimulation mit ESAT-6. Interessanterweise gab es drei Studienteilnehmer, die jeweils starke Reaktivitäten auf die einzelnen Antigene aufwiesen, jedoch einmal eine schwache Reaktion auf TB-2 und zweimal eine schwache Reaktion auf CFP-10 (Abbildung 21 F) zeigten.

4.8 Follow-up

Nach einem medianen *Follow-up* von 3,07 Jahren (IQR 1,692) lebten noch 362 der Patienten. Insgesamt verstarben 64 Patienten nach einer medianen Beobachtungszeit von 1,08 Jahren (IQR 1,24). Nur ein Organtransplantierter erhielt aufgrund des positiven ELISA-Ergebnisses und eines in zeitlicher Nähe stattgefundenen Kontaktes zu einer Person mit aktiver Tuberkulose eine Chemoprävention mit INH. Bei keinem der langfristig nachverfolgten Patienten entwickelte sich eine aktive Tuberkulose über den Beobachtungszeitraum. Der aktive Tuberkulosepatient, der an der Universität des Saarlandes rekrutiert wurde, wurde leitliniengerecht mit den vier Standardantibiotika ab Juni 2016 behandelt. Interessanterweise entwickelte dieser im September 2017 als einziger Patient eine erneute pulmonale aktive Tuberkulose, woraufhin nochmals das Antibiotikaregime angewandt wurde. Leider kam es bei diesem Patienten nach 1,32 Jahren Beobachtung zu einem *loss-of-follow-up*, sodass keine weiteren Aussagen über seinen aktuellen Gesundheitszustand getroffen werden können.

Tabelle 20. *Follow-up*-Daten

Patienten- gruppen	Total	lebend	verstorben	<i>loss-of- follow-up</i>	Entwicklung einer aktiven Tuberkulose
Gesamt	438	362	64	12	1
Kontrollen	84	77	6	1	0
CRF	81	49	32	0	0
SOTR	85	72	12	1	0
SCTR	89	72	14	3	0
RA	98	92	0	6	0
aTB	1	0	0	1	1

5 Diskussion

Mit weltweit 1,7 Milliarden Infizierten betrifft die Erkrankung Tuberkulose etwa ein Viertel der Weltbevölkerung [119]. Im Vergleich zum Vorjahr stieg die Anzahl an Neuerkrankungen im Jahr 2022 von 6,4 auf 7,5 Millionen Menschen. Dies zählt seit Beginn der Aufzeichnungen der WHO leider als Rekordhoch. 1,3 Millionen Erkrankte starben 2022 aufgrund ihrer Infektion [7]. In Anbetracht dieser Zahlen wird deutlich, wie wichtig es ist, die Ausbreitung der Tuberkulose begrenzen zu können. Hierfür spielen die diagnostischen Verfahren zur Detektion einer Infektion mit *M. tuberculosis* eine große Rolle. Ein Bluttest, der der Unterscheidung zwischen einer aktiven und einer latenten Infektion dienen könnte oder ein Bluttest, der eine neu aufgetretene von einer länger bestehenden latenten Infektion differenzieren könnte, würde die Möglichkeit einer gezielten Antibiotika-Therapie eröffnen und somit den Ausbruch der Krankheit eindämmen. Ein durch die Firma Qiagen neu entwickelter IGRA, der QuantiFERON-TB Gold Plus Test, soll vornehmlich im TB-2-Röhrchen CD8-T-Zellen zur IFN- γ -Produktion stimulieren [114]. Es wird postuliert, dass diese Zellen vor allem bei neu aufgetretenen Tuberkuloseinfektionen und aktiven Tuberkulosen vorkommen [113, 120]. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag deshalb auf der Evaluierung dieses neuen Verfahrens. Dabei wurden die Ergebnisse des Testes bei Immungesunden und bei verschiedenen Patientengruppen mit Immundefizienz miteinander verglichen und analysiert. Diese Analysen bildeten eine Subgruppe einer europäischen

Multicenterstudie zur Evaluation dieses Testverfahrens bei immunsupprimierten Patientengruppen. Zudem wurden in einem ausgewählten Kollektiv die reagierenden Zellen durchflusszytometrisch dargestellt und ausgewertet, um die jeweiligen Anteile der reagierenden Zellen quantitativ nachweisen sowie eingehender charakterisieren zu können.

5.1 Evaluation des Studienkollektivs

Zunächst erfolgte eine Analyse der Studienteilnehmer hinsichtlich des Alters. Das Alter der Gruppen unterschied sich nur im Hinblick auf die Dialysepatienten signifikant ($p=0,017$) zu jeder Kohorte, alle anderen Kollektive stellten sich einheitlich dar. Dieses Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass eine regelmäßige Dialyse aufgrund von Nierenversagen meist erst im fortgeschrittenen Alter notwendig wird, wohingegen die anderen Erkrankungen gehäuft in früheren Lebensabschnitten auftreten. Ein Dialysepatient zeigte zudem in der Durchflusszytometrie auf den Stimulus SEB eine Reaktivität unterhalb des DLs, wohingegen sich eine starke Expression auf die Antigene TB-1, TB-2 und ESAT-6 einstellte, weshalb davon ausgegangen wurde, dass seine T-Zellen in der Lage waren, zu reagieren. Gründe für das fehlende Ansprechen auf SEB könnten eine inkorrekte Stimulierung sein (ausbleibende Zugabe von SEB oder BFA) oder dass der Patient auf Basis seiner T-Zellrezeptorausstattung als SEB *Non-Responder* zählte.

5.2 Ergebnisse des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Ergebnisse des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests diskutiert.

5.2.1 Unschlüssige Ergebnisse

In dieser Studie kam es bei fünf immunsupprimierten Patienten, was einem prozentualen Anteil von 1,11 % entsprach, zu einer zu geringen Mitogen-Reaktion, weshalb die Testergebnisse dieser Personen bei gleichzeitig negativer Reaktion der spezifischen Stimuli als unschlüssige Befunde gewertet werden mussten. Mit 2 % unschlüssigen Resultaten lagen dabei die RA am höchsten im Vergleich zu den CRF, SOTR und SCTR, die jeweils zu ca. 1 % unschlüssige Ergebnisse erzielten. Dass sich sowohl bei immunsupprimierten als auch bei immungesunden Personen beim QuantiFERON-TB Gold Plus Test eine sehr geringe Anzahl an unschlüssigen Befunden zeigte und sich der Test daher auch in diesem Patientenkollektiv anwenden lässt, konnte in weiteren Studien bestätigt werden [121, 122]. In einer früheren Multicenter-Studie, in der die Ergebnisse eines Vorläufers des QuantiFERON-TB Plus Testes (QuantiFERON-TB Gold In-Tube) untersucht wurden, ergaben sich weitaus höhere Anteile von unschlüssigen Befunden von bis zu 20 % bei organtransplantierten und stammzelltransplantierten Patienten [123]. Grant et al. stellten außerdem einen Anteil von 7,5 % an unschlüssigen Resultaten bei Dialysepatienten im QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test fest [124]. Dahingehend könnte man eine erhebliche Verbesserung des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests im Vergleich zu dem Vorgänger bei

immunsupprimierten Patienten annehmen. Allerdings wurde bei der direkten Gegenüberstellung der beiden Testverfahren mit dem gleichen Patientenkollektiv bei immunkompromittierten Patienten jeweils eine ähnliche Rate an unschlüssigen Befunden von 3,2 % (10/317) festgestellt [125]. Da bislang nur wenige Studien einen direkten Vergleich der beiden Testgenerationen in Patientenkollektiven mit immunsupprimierten Personen durchführten, lässt sich nicht sicher sagen, ob der QuantiFERON-TB Gold Plus Test gegenüber seinem Vorgänger in diesen Patientengruppen eine Verbesserung hinsichtlich der unschlüssigen Ergebnisse liefert. Da ein unschlüssiger Befund allein auf der Reaktivität im NIL- bzw. Mitogen-Röhrchen beruht, können tatsächliche Unterschiede des Anteils unschlüssiger Resultate zwischen beiden Testverfahren ausschließlich auf Unterschiede in diesen beiden Röhrchen zurückzuführen sein. Ein Grund hierfür könnte die Antigenbeschichtung darstellen, da diese in den Röhrchen des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests, im Vergleich zu einer Harzbeschichtung beim QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test, sprühgetrocknet ist. Durch das Beschichtungsverfahren sollen sich die Antigene besser mit dem Patientenblut vermischen. Dies wiederum könnte zu einer erhöhten IFN- γ -Mitogenreaktion führen, welche oft den limitierenden Faktor bei unschlüssigen Ergebnissen darstellt [126]. Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass der QuantiFERON-TB Gold Plus Test keine Nachteile im Vergleich zu seinem Vorgänger hinsichtlich unschlüssiger Testergebnisse aufweist.

5.2.2 Positive und negative Testergebnisse

In der vorliegenden Arbeit erzielten 11,8 % (53/448) der Probanden ein positives Testergebnis, was annähernd der LTBI-Rate von ca. 10 % in Deutschland entspricht. In der japanischen Bevölkerung liegt diese bei ca. 5 %, weshalb das Ergebnis der mit dem QuantiFERON-TB Gold Plus ermittelten LTBI-Rate für nierentransplantierte Personen in Japan von ca. 5 % mit unseren Resultaten sehr gut übereinstimmt [127]. Barcellini et al. erzielten vergleichbare Werte in der Gruppe der aTB und niedrigere Raten an positiven Ergebnissen in der Kontrollgruppe [121]. Dies lässt sich anhand der Vorselektion der Gruppe erklären, da in unserer Studie immungesunde Probanden als Kontrollgruppe eingeschlossen wurden, welche jedoch nicht weiter hinsichtlich der möglichen Risikofaktoren für eine TB selektiert wurden. Im Gegensatz dazu wurden in der Studie von Barcellini ausschließlich Personen, die anamnestisch ein geringes TB-Risiko aufwiesen, inkludiert [121]. In unserer Arbeit wurden positive Raten von nur 6 % und 4 % bei den SCTR und RA detektiert. Diese abweichende Prozentzahl an positiven Ergebnissen im Vergleich zu den anderen Probandengruppen lässt sich am ehesten durch die natürliche Varianz der Studienpopulation erklären. Beim Vergleich der Reaktionsprofile von SCTR und RA mit den anderen Probandengruppen zeigten sich in dieser Studie sowohl bei den positiv getesteten Probanden als auch bei den negativ getesteten Probanden keine Unterschiede. Es gibt daher keine Hinweise für eine verminderte Reaktivität der T-Zellen der SCTR und der RA auf die verwendeten Antigene. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen, dass sich bei Personen mit immunsuppressiver Biologika-Therapie deutliche Reaktivitäten auf die TB-1- und TB-2-Röhrchen feststellen lassen, solange ausreichende Mengen an CD4- und CD8-T-Zellen vorhanden sind [122, 128, 129].

Mit der einerseits sehr geringen Rate an unschlussigen Befunden (1,11 %) und der andererseits der LTBI-Rate entsprechend festgestellten positiven Ergebnissen, kann der neue QuantiFERON-TB Gold Plus Test äquivalent zum Vorgänger auch bei Immunsupprimierten angewandt werden. Diese Erkenntnisse wurden im direkten Vergleich des QuantiFERON-TB Gold In-Tube Tests mit der neuen Version, dem QuantiFERON-TB Gold Plus Test, bestätigt. Dort zeigte sich eine hohe Übereinstimmung beider Testverfahren von bis zu 96 % sowohl für immungesunde als auch immunsupprimierte Personen [125, 130-133].

5.2.3 Diskordante Ergebnisse

In Übereinstimmung mit bisher publizierten Daten zeigte der QuantiFERON-TB Gold Plus Test in unserer Studie eine sehr gute Korrelation zwischen dem TB-1- und TB-2-Röhrchen. [130, 134, 135]. Trotz der sehr guten Korrelation stellten sich regelhaft diskordante Befunde der beiden Röhrchen dar. Dabei ergaben sich, wie auch in unserer Studie gezeigt, häufiger positive Ergebnisse im TB-2- als im TB-1-Röhrchen [126, 130, 135]. Allgemein stellt sich bei diskordanten Resultaten die Frage, durch welches Röhrchen das wahre Testergebnis angezeigt wird. Um diese beantworten zu können, wurde aufgrund fehlender Goldstandards in der Diagnostik der LTBI das Blut aller Probandengruppen, mit Ausnahme der Blutproben aller aTB, zusätzlich mit dem Antigen PPD stimuliert. PPD ist nicht spezifisch für das *M. tuberculosis*, weshalb mehr Menschen positiv auf dieses Antigen im Vergleich zu den im QuantiFERON-TB Gold Plus Test spezifischen Antigenen ESAT-6 und CFP-10 ansprechen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Patienten, die im PPD nicht stark genug reagierten, als falsch-positiv durch die jeweiligen Röhrchen des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests detektiert wurden.

Im Vergleich zu unseren Ergebnissen zeigten andere Studien eine bei aTB verstärkte, alleinige IFN- γ -Reaktion auf das TB-2-Röhrchen [121, 136-138]. Gründe dafür könnten die zusätzlich eingefügten kleinen CFP-10 Peptide im TB-2-Röhrchen sein, welche die CD8-T-Zellen zu einer IFN- γ -Reaktion anregen sollen [139]. Diese Erkenntnis wird theoretisch durch die wichtige Rolle der CD8-T-Zellen bei der Bekämpfung von insbesondere aktiven Tuberkulosen gestützt [120, 140, 141]. Praktisch ließ sich jedoch in unserer Studie durch die Durchflusszytometrie feststellen, dass bei aTB im TB-2-Röhrchen nicht vermehrt CD8-T-Zellen an der Immunabwehr beteiligt waren und sich der Anteil an CD8-T-Zellen im TB-1- im Vergleich zum TB-2-Röhrchen im Median sogar höher darstellte (eine detaillierte Diskussion dieser Erkenntnisse folgt in Abschnitt 5.3.1). Ein anderer Grund für die diskordanten Befunde könnte die Testvariabilität darstellen, bei der es in Mehrfachtestungen zu unterschiedlichen Testergebnissen trotz derselben Probanden und derselben Untersuchungsbedingungen kommt [133, 142-144]. Die Testvariabilität kann erklären, warum diskordante Resultate überhaupt entstehen können und wieso manche Probanden ausschließlich auf das TB-1- und nicht auf das TB-2-Röhrchen reagierten, obwohl im TB-2-Röhrchen die gleichen Antigene enthalten sind und zusätzlich noch weitere. Neben der Testvariabilität und den falsch-positiven Resultaten kann auch die Höhe des DLs bei 0,35 IU/ml zu diskordanten Ergebnissen führen. Die Bereiche zwischen 0,2 IU/ml – 0,34 IU/ml und 0,35 IU/ml – 0,69

IU/ml wurden für den QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test als Grauzone bezeichnet und von einigen Autoren für die neue Generation der IGRAs übernommen [122, 134, 145]. In unserer Studie befanden sich sechs von acht diskordanten Ergebnissen innerhalb des Grauzonenbereichs. Es bestehen Empfehlungen dafür, Personen im Grauzonenbereich erneut zu testen bzw. Werte im Bereich des DLs nicht strikt zu interpretieren [133, 142, 146]. In der Praxis sollte vor allem bei diesen Patienten das anamnestische und klinische Risiko einer Infektion erhoben und bei weiterhin bestehender Unsicherheit der Test wiederholt werden.

5.2.4 Logistische Regression

Personen mit Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Rauchen und der Abstammung aus Ländern mit hoher Inzidenzrate weisen ein erhöhtes intrinsisches Risiko auf, an Tuberkulose zu erkranken. Schätzungsweise stehen 15 % aller Tuberkulosefälle weltweit in Verbindung mit einer Diabetes mellitus Erkrankung [147]. Die Tuberkuloseprävalenz bei Diabetes mellitus Patienten ist im Gegensatz dazu gering, was durch die Resultate der logistischen Regression bestätigt werden konnte [148]. Zwischen dem Risikofaktor Rauchen und einer Tuberkuloseerkrankung konnte eine starke Assoziation ermittelt werden [147]. Die Ergebnisse in dieser Studie erscheinen zunächst konträr dazu. Jedoch konnten Aabye et al. nachweisen, dass Raucher vermehrt falsch-negative oder unschlüssige Befunde im QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test erzielten [149]. Auch wenn Daten hierzu noch fehlen, kann davon ausgegangen werden, dass sich diese Erkenntnisse auf den QuantiFERON-TB Gold Plus Test übertragen lassen. Personen mit dem Risikofaktor Immigration aus Ländern mit einer höheren Tuberkuloseinzidenz zeigen allgemein ein größeres Risiko für ein positives Testergebnis. Diese Tendenz entsprach der 1,8-fach höheren Chance dieser Personengruppe gegenüber Menschen ohne Migrationshintergrund, erreichte jedoch am ehesten aufgrund der geringen Probandenzahl keine Signifikanz. Der einzig signifikante Unterschied im QuantiFERON-TB Gold Plus Test war das Merkmal männliches Geschlecht. Dass Männer ein höheres Risiko als Frauen für eine aktive Tuberkulose in Ländern mit niedrigem oder mittlerem Einkommensniveau haben, wurde schon in den 90-er Jahren festgestellt und konnte 2016 erneut bekräftigt werden [150]. Dies wurde auf eine geringere Nutzung von Gesundheitseinrichtungen durch Männer und daher einer verminderten Diagnostik- und Therapiemöglichkeit von Männern zurückgeführt. Ebenso bestätigten neuere Daten aus Monaco und aus China ein erhöhtes LTBI-Risiko bei männlichen Probanden [151, 152]. Gründe für diese Resultate in Ländern mit niedrigem Tuberkuloserisiko sowie niedrigem bis hohem Einkommensniveau konnten noch nicht eindeutig exploriert werden und müssten mit spezialisierten Fragebögen evaluiert werden. Risikofaktoren für einen positiven TST und somit auch Risikofaktoren für ein positives PPD-Ergebnis stellen generell ein höheres Lebensalter und das männliche Geschlecht dar [153]. Diese Faktoren stimmten nicht mit denen der logistischen Regression dieser Studie überein, in der sich als einzig signifikantes Merkmal die Zugehörigkeit zur Kontrollgruppe zeigte. Es gibt keine größeren Studien, die dieses Resultat bestätigen können, sodass davon ausgegangen werden muss, dass es sich um ein zufälliges Bias in der

Kontrollgruppe handelte. Im Gegensatz dazu ergab eine BCG-Impfung keinen signifikanten Zusammenhang mit einem positiven PPD-Testergebnis. Dies steht im Kontrast zu früheren Arbeiten, in welchen signifikante Assoziationen zwischen BCG-Impfung und positivem TST nachgewiesen werden konnten [154, 155]. Insgesamt zeigte sich jedoch eine 1,4-fach höhere Chance als Geimpfter ein positives PPD-Ergebnis zu bekommen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass eine Signifikanz bei größeren Probandenzahlen erreicht werden kann.

5.2.5 Spezifität und Sensitivität

Die in dieser Studie ermittelte Spezifität des neuen IGRA von 94,5 % stimmt mit der bestehenden Literatur überein, in der Werte zwischen 95 % und 100 % erreicht wurden. Dabei wurden in der Studie von Barcellini et al. nur ca. 4 % immunsupprimierte Probanden eingeschlossen und in der Studie von Sauzollo et al. keine [121, 156]. Ebenso beschreiben die Herstellerangaben eine Spezifität von > 97 % und eine Sensitivität von > 94 % [114]. Die neue Generation zeigte sich daher sogar bei immunsupprimierten Probanden äquivalent zum QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test [157, 158]. Bei der Betrachtung der Sensitivitäten der einzelnen Röhrchen waren diese im Vergleich zur festgestellten Gesamtsensitivität von 90,9 % geringer. Dabei ergab sich für das TB-1-Röhrchen eine Sensitivität von 81,8 % und für TB-2 eine von 72,7 %. Eine Metaanalyse zum QuantiFERON-TB Gold Plus Test fand im TB-1-Röhrchen mit einer gepoolten Sensitivität von 91 % und im TB-2-Röhrchen von 95 % weitaus höhere Sensitivitäten verglichen mit unseren Daten [159]. Dies lässt sich dadurch erklären, dass in unserer Studie vor allem immunsupprimierte Probanden untersucht wurden (78,8 %), bei deren Testung eher falsch-negative Testergebnisse zu erwarten sind. Im Vergleich dazu beschreibt die Studie von Sotgiu et al. explizit in den Limitationen, dass immunsupprimierte Personen nicht ausreichend in der Gesamtkohorte vertreten waren [159]. In der Studie von Barcellini et al. konnte beim Ausschluss von immunsupprimierten Probanden ein Anstieg der Sensitivität erreicht werden [121]. Die Gesamtsensitivität von 94 % stimmte jedoch annähernd mit unseren Daten überein. Weitere Studien verzeichneten ebenfalls mit unseren Ergebnissen vergleichbare Sensitivitäten. Im Gegensatz zu unserer Arbeit gibt es jedoch Studien, bei denen das TB-2-Röhrchen die Sensitivität erhöhte [121, 128, 156]. Dieser Unterschied könnte sowohl durch die geringe Probandenzahl in der Gruppe der aTB in unserem Patientenkollektiv erklärt werden, als auch durch die vorwiegende Testung von immunsupprimierten Probanden. Insgesamt fand sich in den beschriebenen Untersuchungen jedoch eine statistisch nicht signifikante Verbesserung der Sensitivität gegenüber der des QuantiFERON-TB Gold In-Tube Tests [90, 160]. Zusammenfassend lässt sich der neue IGRA als Diagnostikum aufgrund der insgesamt hohen Spezifität und Sensitivität auch bei immunsupprimierten Patienten einsetzen.

5.2.6 Differenz des TB-2- und TB-1-Röhrchens und positiv prädiktiver Wert

Der Hersteller postuliert, dass durch die zusätzlichen Peptide im TB-2-Röhrchen vor allem die CD8-T-Zellen die IFN- γ -Produktion übernehmen und dies bevorzugt bei aTB oder Personen vorkommt, die sich erst kürzlich infiziert haben oder geringe CD4-T-Zell-Level aufweisen [114]. Die Differenz aus den IFN- γ -Werten des TB-2- und des TB-1-Röhrchens sollte diesem Prinzip folgend stellvertretend für die CD8-T-Zellantwort stehen. Der in dieser Studie errechnete positiv prädiktive Wert des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests für aTB betrug 28,6 %. Bei Betrachtung des positiv prädiktiven Wertes zur Entwicklung einer aktiven Tuberkulose bei Patienten mit LTBI ergab sich in dieser Studie ein Wert von 0 %. Anamnestisch stand kein Patient mit LTBI kürzlich in Kontakt zu einer Person mit aktiver Tuberkulose. Dies erschwerte einen Vergleich unserer Studie mit der Metaanalyse von Zhou et al., in dem ein gepoolter positiv prädiktiver Wert von 4,8 % für den QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test in insgesamt 23 Studien festgestellt wurde [161]. Zusammenfassend zeigt sich jedoch, dass die alleinige Verwendung der QuantiFERON-Tests keine valide Aussage über das Progressionsrisiko einer LTBI zu einer aktiven Tuberkulose treffen kann und dass auch die Verwendung der beiden Röhrchen des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests nicht ausreicht, um eine aktive von einer latenten Tuberkulose zu unterscheiden. Stattdessen sollte der individuelle klinische Zustand des Patienten betrachtet und weiterhin die direkten Nachweisverfahren genutzt werden. Unsere Ergebnisse zeigten, dass zwar prozentual mehr aTB eine Differenz $> 0,6$ IU/ml aufwiesen, die zum Teil als klinisch relevante Differenz postuliert wird [117]. Letztendlich konnte aber keine statistische Signifikanz ($p=0,69$) zwischen den Differenzen der aTB und Patienten mit LTBI dargestellt werden. Eine große Multicenterstudie mit über 686 Patienten bestätigte die These, dass die Differenz kein Marker für eine kürzlich stattgehabte Infektion darstellt [162]. Diese Erkenntnisse werden von weiteren Studien unterstützt [132, 138, 163]. Andere hingegen stellten einen signifikanten Unterschied in der Differenz von Personen mit LTBI und aktiver Tuberkulose und zwischen Personen, die vermehrt oder erst kürzlich exponiert waren, fest [117, 130, 136, 146, 164]. Die Frage, warum es verschiedene Resultate hinsichtlich der Differenz gibt, könnte einerseits durch die geringe Größe der einzelnen Studienpopulationen beantwortet werden. Andererseits zeigten unsere durchflusszytometrischen Messungen, dass sich die Höhe der CD8-T-Zellantwort weder im TB-1- noch im TB-2-Röhrchen signifikant zwischen den als negativ, latent oder aktiv getesteten Personen unterschied. Daher lässt sich die erhöhte mediane IFN- γ -Antwort im TB-2-Röhrchen der als positiv getesteten Patientengruppen, die ebenfalls in anderen Studien bestätigt wurde, durch eine erhöhte IFN- γ -Produktion von sowohl CD4- als auch von CD8-T-Zellen auf die zusätzlich eingesetzten kleinen CFP-10 Peptide erklären [126, 128, 134, 138, 156, 165, 166]. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Differenz der beiden Röhrchen nicht als Parameter einer aktiven Tuberkulose oder kürzlich stattgefundener Infektion herangezogen werden sollte.

5.3 Durchflusszytometrische Analyse des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests

Die Durchflusszytometrie gilt sowohl bei Gesunden als auch bei Immunsupprimierten als etabliertes Verfahren zur Detektion einer Infektion mit *M. tuberculosis* [96, 167-169]. Dies konnte durch die hoch signifikante Korrelation ($p < 0,0001$) zwischen der FACS-Analyse und den QuantiFERON-TB Gold Plus TB-1- und TB-2-Röhrchen bestätigt werden. Wie zu erwarten, stellten sich die stärksten Korrelationen ($r = 0,5534$, $r = 0,5640$) zwischen den TB-1- und TB-2-Röhrchen und der Summe aus den IFN- γ -Antworten auf die ESAT-6 und CFP-10 Proteine ein. Dies lässt sich dadurch erklären, dass in beiden Röhrchen die Antigene ESAT-6 und CFP-10 enthalten sind und somit ein Äquivalent zur separaten Stimulation mit diesen beiden darstellen. Die nicht signifikante ($p > 0,99$), jedoch im Median höhere Reaktion der Zellen auf die Summe aus ESAT-6 und CFP-10, kann auf die unterschiedliche Proteidlänge der Antigene zurückgeführt werden. Je nach Peptidlänge werden die T-Zellen unterschiedlich stark zur Reaktivität angeregt [170]. Im TB-1- und TB-2-Röhrchen wurden kleinere Peptidgemische verwendet, wohingegen die von uns verwendeten ESAT-6 und CFP-10 Antigene Proteine darstellen, wodurch sich die unterschiedliche Stärke der Reaktivität erklären lässt. Das Resultat der Korrelationsanalyse spiegelte sich auch beim Vergleich der qualitativen Ergebnisse wider. Aufgrund des gleichen Testprinzips erbrachten die durchflusszytometrisch gemessenen Resultate eine höhere Abhängigkeit untereinander als die beim Vergleich des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests mit den durchflusszytometrisch gemessenen Daten. Insgesamt zeigten sich jedoch alle Vergleiche mit statistischer Signifikanz. Diese Arbeit führte zum ersten Mal eine Korrelationsanalyse zwischen den Stimuli des QuantiFERON-TB Gold Plus und den Antigenen ESAT-6 und CFP-10 in den oben genannten Patientenkollektiven durch. Ebenso wurde die qualitative Auswertung bisher nie beschrieben, weshalb ein Vergleich mit der Literatur zum aktuellen Zeitpunkt nicht möglich ist. Insgesamt ergab die durchflusszytometrische Analyse, dass sowohl die CD4- als auch die CD8-T-Zellen auf die in den QuantiFERON-TB Gold Plus Röhrchen verwendeten Antigene ohne signifikante Unterschiede mit einer IFN- γ -, TNF- α - und IL-2-Produktion reagierten. In der Arbeit von Petruccioli et al. wurden diese Ergebnisse bestätigt. Dort zeigten lediglich an HIV erkrankte Personen schwächere TNF- α - und IL-2-CD4-T-Zellantworten im Vergleich zu kürzlich an LTBI erkrankte Personen, was auf die reduzierten CD4-T-Zellen bei HIV-Patienten zurückgeführt wurde [171]. Die Ergebnisse von Jung et al. bestätigten ein gutes Ansprechen der T-Zellen auf die Stimuli auch in immunkomprimierten Probandengruppen [172]. Aufgrund der adäquaten T-Zellreaktionen eignet sich der QuantiFERON-TB Gold Plus Test als Diagnostikum einer LTBI.

5.3.1 Durchflusszytometrischer Vergleich der T-Zellreaktionen der einzelnen Probandengruppen

In dieser Studie konnte ein signifikanter Unterschied der IFN- γ -Antwort der reaktiven CD4-T-Zellen auf die Stimuli TB-1 und TB-2 zwischen gesunden Kontrollen und Personen mit LTBI und aTB durchflusszytometrisch bestätigt werden. Daher konnte übereinstimmend zu früheren Daten gezeigt

werden, dass sich der neue IGRA als diagnostisches Mittel zur Detektion einer LTBI eignet [136, 173]. Bisher sind keine weiteren Studien bekannt, die die Herkunft der freigesetzten Zytokine im QuantiFERON-TB Gold Plus Test in den hier getesteten immunsupprimierten Probandengruppen evaluierten. Diese Arbeit zeigte dadurch zum ersten Mal, dass sich weder die reaktiven CD4- noch die reaktiven CD8-T-Zellen von immunsupprimierten Menschen im QuantiFERON-TB Gold Plus Test von immungesunden Personen mit LTBI und aTB unterschieden und dass sich keine höhere CD8-T-Zellantwort im TB-2-Röhrchen bei aTB im Vergleich zu gesunden oder immunsupprimierten Menschen mit einem positiven QuantiFERON-TB Gold Plus Test darstellen ließ. Jung et al. untersuchten ebenso aTB und immunsupprimierte Probanden nach solider Organtransplantation, Personen nach Stammzelltransplantation und mit systemischer Autoimmunerkrankung. Dabei lag das Hauptaugenmerk jedoch auf dem Vergleich der CD4- und CD8-T-Zellantworten zwischen dem QuantiFERON-TB Gold Plus Test und dem E TB-FERON ELISA innerhalb einer Patientengruppe und nicht auf dem Vergleich zwischen den verschiedenen Patientengruppen. In Bezug auf den QuantiFERON-TB Gold Plus Test kam es bei Jung et al. lediglich bei den aTB zu einer statistisch signifikant höheren CD4-T-Zellantwort auf die Stimulation mit TB-1 im Vergleich zu TB-2. In der Diskussion wurde darauf jedoch nicht näher eingegangen. [172]. Lediglich die erste Publikation zur durchflusszytometrischen Untersuchung des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests bei aTB lieferte eine signifikant höhere CD8-T-Zellantwort im TB-2- im Vergleich zum TB-1-Röhrchen sowie eine höhere CD8-T-Zellantwort bei aTB im Vergleich zu Personen mit LTBI [136]. Diese Studie unterschied sich jedoch bei der Durchführung der Durchflusszytometrie von unserer in verschiedenen Punkten. Einerseits wurden unsere Blutproben aus Borstel verschickt, wohingegen Petruccioli et al. die Proben direkt verarbeiteten. Zudem verwendeten Petruccioli et al. PBMCs anstelle von Vollblut und stimulierten ihre Proben bis zu 24 Stunden, wohingegen wir eine Kurzzeitstimulation von 6 Stunden durchführten. In einer zweiten von dieser Arbeitsgruppe durchgeführten Studie zeigten sich die Ergebnisse jedoch äquivalent zu unseren Resultaten [171]. Dabei wurde die Durchflusszytometrie sowohl bei Menschen mit HIV-Erkrankung als auch bei gesunden Personen mit aktiver Tuberkulose oder Menschen mit LTBI nach Stimulation mit den Antigenen des TB-1- und TB-2-Röhrchens angewandt. Dabei ergab sich kein Unterschied in den CD8-T-Zellantworten, bezogen auf die Zytokinexpression von IFN- γ , TNF- α und IL-2 zwischen den einzelnen Patientengruppen im TB-1- und TB-2-Röhrchen. Lediglich die CD4-T-Zellantwort war erwartungsgemäß in der Gruppe der HIV-Patienten verglichen mit den gesunden Kontrollen erniedrigt. Eine weitere durchflusszytometrische Untersuchung von Sauzullo et al. erbrachte ebenso keinen signifikanten Unterschied der CD8-T-Zellantworten im TB-2- im Vergleich zum TB-1-Röhrchen bei immungesunden Patienten mit aktiver Tuberkulose. Die CD4-T-Zellantwort dominierte dort äquivalent in beiden Röhrchen [156].

Insgesamt konnte anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten die Hypothese, dass durch das TB-2-Röhrchen vermehrt CD8-T-Zellen bei aTB reagieren, nicht bestätigt werden. Durch die Verwendung des TB-2-Röhrchens ergeben sich daher keine Zusatzinformationen [173].

5.3.2 ESAT-6 als potenzielles prognostisches Antigen zur Differenzierung zwischen LTBI und aTB

Die einzig statistisch signifikante Unterscheidung zwischen negativen, latent und aktiv infizierten Probanden lieferte in dieser Studie die CD8-T-Zellantwort auf die Stimulierung mit dem Antigen ESAT-6, wohingegen in dieser Zellpopulation keine Unterschiede auf den Stimulus CFP-10 feststellbar waren. Die Ergebnisse wurden durch die interindividuelle Auswertung unterstützt. Diese zeigte, dass sich die geringste ESAT-6 Antwort bei den negativen Probanden einstellte und die höchste bei den aTB. Dort reagierten sowohl die CD4- als auch die CD8-T-Zellen im Median deutlich stärker auf ESAT-6 als auf CFP-10. Dies steht in Kontrast zu früheren Beobachtungen, bei denen vor allem auf das Antigen CFP-10 im Vergleich zu ESAT-6 eine CD8-T-Zell-IFN- γ -Antwort festgestellt werden konnte [113]. Dabei zeigten statistisch signifikant mehr Patienten mit aktiver als latenter Tuberkulose eine CD8-T-Zell-IFN- γ -Antwort in der Durchflusszytometrie, jedoch ohne Signifikanz in der Stärke der Antwort. In unserer Studie reagierten zudem die CD4-T-Zellen der aTB signifikant höher auf das Antigen ESAT-6 als die der negativen Probanden. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob die Zugabe von ESAT-6 Peptiden in das TB-2-Röhrchen anstelle von kleinen CFP-10 Fragmenten einer Diskriminierung zwischen einer aktiven Tuberkulose und einer LTBI dienen könnte. Bestimmte CFP-10 Epitope sprechen vor allem entweder nur CD8- oder nur CD4-T-Zellen an [174], wohingegen andere Epitope von beiden erkannt werden [175, 176]. Das Antigen ESAT-6 kann ebenso je nach Epitop mit nur einem oder beiden T-Zelltypen interagieren und spielt unter anderem bei chronischen Infektionen eine wichtige Rolle [177-180]. Studien liefern bisher Hinweise darauf, dass CD4-T-Zellen von aTB stärker auf ESAT-6 Peptide reagieren als die von Probanden mit LTBI [181], wohingegen CD8-T-Zellen allgemein eher bei Menschen reagieren, die kürzlich Kontakt zu aTB hatten, als bei den aktiv Erkrankten selbst [182]. Insgesamt betrachtet kommt es daher auf die exakten Epitope der ESAT-6 und CFP-10 Peptide an, ob CD8-T-Zellen von aTB vermehrt mit einer IFN- γ -Antwort reagieren oder nicht. Zukünftig sollten Studien zur Stimulation der T-Zellen mit verschiedenen Epitopen von ESAT-6 durchgeführt werden, um eine eventuelle Unterscheidung von Gesunden, Personen mit LTBI und aTB treffen zu können und eine potenzielle Progression von einer LTBI zu einer aktiven Tuberkulose vorhersagen zu können.

5.4 Follow-up

Die Ergebnisse der Nachverfolgung der Patienten zeigten, dass auch bei immunsupprimierten Patienten die Entwicklung einer aktiven Tuberkulose bei positivem QuantiFERON-TB Gold Plus Test eine Rarität darstellt, wenn die Ansteckung mehrere Jahre zurückliegt. Dies steht im Einklang mit der bisher veröffentlichten Literatur. Dort konnte der Nachweis erbracht werden, dass Patienten nach autologer

Stammzelltransplantation keine höhere Rate an aktiver Tuberkuloseinfektion im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen [183]. Lediglich Menschen nach allogener Transplantation zeigten ein leicht höheres Risiko, jedoch trat dies insgesamt bei nur 0,4 % der getesteten Personen auf. Ebenso stellt bei Patienten, die an einer rheumatoiden Arthritis leiden, die Entwicklung einer aktiven Tuberkulose eine Ausnahme dar [184]. Eine multizentrische Studie, die die aktive Tuberkuloserate bei Patienten nach solider Organtransplantation untersuchte, konnte in Zentraleuropa eine niedrige Inzidenzrate von 3,1 feststellen [185]. Menschen im südlichen Europa hingegen zeigten mit einer Inzidenzrate von 14 häufiger eine aktive Tuberkulose nach der Organtransplantation. Unsere Arbeitsgruppe war Teil dieser Studie und konnte mit der Untersuchung des teilweise identischen Patientenkollektivs die Ergebnisse der anderen Zentren stützen. Die Gabe der Chemoprävention sollte demnach nicht allein anhand des Immunstatus, sondern nach einer individuellen Risikoeinstufung erfolgen. Zusätzlich zeigte das *Follow-up*, dass die Differenz von $> 0,6$ IU/ml kein Surrogatmarker für eine Progression einer LTBI zu einer aktiven Tuberkulose darstellt.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals festgestellt werden, dass der QuantiFERON-TB Gold Plus Test zur Detektion einer latenten Tuberkulose nicht nur bei gesunden Kontrollen, sondern auch in verschiedenen immungeschwächten Patientenpopulationen angewandt werden kann. Dabei unterschied sich die Stärke der IFN- γ -Antwort zwischen allen immunsupprimierten Probanden und Kontrollen nicht signifikant. Durch seinen nur sehr geringen Anteil (1,11 %) an unschlüssigen Ergebnissen in allen Probandengruppen bietet er leichte Vorteile gegenüber dem QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test. Hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität ergaben sich in allen Patientengruppen ähnliche Resultate wie beim Vorgängermodell. In unserem Patientenkollektiv zeigte sich kein Zusammenhang zwischen einem positiven Testergebnis und den bekannten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Tuberkulose. Aufgrund einer nicht ausreichenden Diskriminierung zwischen einer aktiven von einer latenten Tuberkulose, die mit einem geringen positiv prädiktiven Wert einhergeht, bietet der Test jedoch keine Vorteile gegenüber dem QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test. Die bisher postulierte erhöhte CD8-T-Zellantwort im TB-2-Röhrchen bei aTB konnte durch die durchflusszytometrischen Messungen in dieser Studie eindeutig widerlegt werden. Entgegen der bisher angenommenen vermehrten CD8-T-Zellantwort auf kleine CFP-10 Peptide im TB-2-Röhrchen ließ sich eine stärkere CD8-T-Zellantwort der aTB auf ESAT-6 Fragmente messen. Die Nutzung von zusätzlichen Peptidfragmenten von ESAT-6 Antigenen im TB-2-Röhrchen oder die Änderung der Epitope der CFP-10 Peptide in diesem Röhrchen könnten in Zukunft eine Möglichkeit für IGRAs darstellen, zwischen nicht infizierten, latent infizierten und Personen, die an einer aktiven Erkrankung leiden, zu unterscheiden. Des Weiteren könnten diese Stimulationen gegebenenfalls mithilfe eines geeigneten DLs oder der Differenz der Röhrchen eine prognostische Aussage treffen, welche Patienten eine aktive Tuberkulose entwickeln und dementsprechend präventiv behandelt werden müssen. Zusätzlich könnte die Forschung an neuen

Biomarkern die Diagnostik, die Progressionsvorhersage und auch die Therapieüberwachung revolutionieren. Aktuell stehen bereits eine Vielzahl an Biomarkern zur Verfügung, die teilweise bereits kommerzielle Anwendung in der Diagnostik gefunden haben [186-188]. Es bleibt zu hoffen, dass durch weitere Marker neue Forschungsansätze entstehen, denn die Kombination aus adäquaten diagnostischen Tests mit neuen kürzeren Regimen zur präventiven Chemotherapie, würde einen entscheidenden Schritt im Kampf gegen Tuberkulose liefern.

6 Literaturverzeichnis

1. Donoghue, H.D., et al., *Tuberculosis in Dr Granville's mummy: a molecular re-examination of the earliest known Egyptian mummy to be scientifically examined and given a medical diagnosis*. Proc Biol Sci, 2010. 277(1678): p. 51-6.
2. Sakula, A., *Robert Koch: centenary of the discovery of the tubercle bacillus, 1882*. Thorax, 1982. 37(4): p. 246-51.
3. Calmette, A., *La vaccination préventive contre la tuberculose par le "BCG,"*. 1927, Paris: Masson et cie.
4. Schatz, A., E. Bugie, and S.A. Waksman, *Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria*. 1944. Clin Orthop Relat Res, 2005(437): p. 3-6.
5. Luca, S. and T. Mihaescu, *History of BCG Vaccine*. Maedica (Bucur), 2013. 8(1): p. 53-8.
6. World Health Organization. *TB A Global Emergency*. 1994 06.06.2021]; Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/58749/WHO_TB_94.177.pdf?sequence=1.
7. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2023*. 2023 11.11.2023]; Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/373828/9789240083851-eng.pdf?sequence=1>.
8. Zaheen, A. and B.R. Bloom, *Tuberculosis in 2020 - New Approaches to a Continuing Global Health Crisis*. N Engl J Med, 2020. 382(14): p. e26.
9. Robert Koch Institut. *Epidemiologisches Bulletin*. 2023 14.10.2023]; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2023/Ausgaben/11_23.pdf?__blob=publicationFile.
10. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2021*. 2021 13.11.2021]; Available from: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>.
11. Janeway, C., et al., *Janeway Immunologie*. Spektrum, Akad. Verl, Heidelberg, 2009. 7: p. 66, 232 ff., 240 f., 268, 436 ff., 444, 453, 466, 468, 469, 470, 738, 827 f., 829, 833.
12. Robert Koch Institut. *Tuberkulose, RKI-Ratgeber*. 2013 06.06.2021]; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tuberkulose.html#doc2374486bodyText2.
13. Mims, C., et al., *Medizinische Mikrobiologie, Infektiologie*. 2006: Urban & Fischer.
14. Alderwick, L.J., et al., *The Mycobacterial Cell Wall--Peptidoglycan and Arabinogalactan*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. 5(8): p. a021113.
15. Wolf, A.J., et al., *Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo*. J Immunol, 2007. 179(4): p. 2509-19.
16. Armstrong, J.A. and P.D. Hart, *Response of cultured macrophages to Mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes*. J Exp Med, 1971. 134(3 Pt 1): p. 713-40.
17. Sturgill-Koszycki, S., et al., *Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase*. Science, 1994. 263(5147): p. 678-81.
18. Chan, J., et al., *Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages*. J Exp Med, 1992. 175(4): p. 1111-22.
19. Tascon, R.E., et al., *Protection against Mycobacterium tuberculosis infection by CD8+ T cells requires the production of gamma interferon*. Infect Immun, 1998. 66(2): p. 830-4.
20. Feruglio, S.L., et al., *Early dynamics of T helper cell cytokines and T regulatory cells in response to treatment of active Mycobacterium tuberculosis infection*. Clin Exp Immunol, 2015. 179(3): p. 454-65.
21. Caruso, A.M., et al., *Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis*. J Immunol, 1999. 162(9): p. 5407-16.
22. van der Wel, N., et al., *M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells*. Cell, 2007. 129(7): p. 1287-98.

23. de Jonge, M.I., et al., *ESAT-6 from Mycobacterium tuberculosis dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity*. J Bacteriol, 2007. 189(16): p. 6028-34.
24. Winau, F., et al., *Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis*. Immunity, 2006. 24(1): p. 105-17.
25. Dascher, C.C. and M.B. Brenner, *CD1 antigen presentation and infectious disease*. Contrib Microbiol, 2003. 10: p. 164-82.
26. Algood, H.M., P.L. Lin, and J.L. Flynn, *Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis*. Clin Infect Dis, 2005. 41 Suppl 3: p. S189-93.
27. Roach, D.R., et al., *TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection*. J Immunol, 2002. 168(9): p. 4620-7.
28. Ramakrishnan, L., *Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis*. Nat Rev Immunol, 2012. 12(5): p. 352-66.
29. Stewart, G.R., B.D. Robertson, and D.B. Young, *Tuberculosis: a problem with persistence*. Nat Rev Microbiol, 2003. 1(2): p. 97-105.
30. Vyas, S.P. and R. Goswami, *Striking the right immunological balance prevents progression of tuberculosis*. Inflamm Res, 2017. 66(12): p. 1031-1056.
31. Ndlovu, H. and M.J. Marakalala, *Granulomas and Inflammation: Host-Directed Therapies for Tuberculosis*. Front Immunol, 2016. 7: p. 434.
32. Gerd Herold, *Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung : 2017 : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*. 2016: Gerd Herold. 47, 76, 61, 86, 100, 415 ff., 412 ff., 421, 657 ff., 661 f., 663.
33. Sloot, R., et al., *Risk of tuberculosis after recent exposure. A 10-year follow-up study of contacts in Amsterdam*. Am J Respir Crit Care Med, 2014. 190(9): p. 1044-52.
34. World Health Organization. *WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 1: Prevention - Tuberculosis preventive treatment*. 2020 12.11.2023]; Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/331170/9789240001503-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
35. Institut, R.K. *Tuberkulose-Impfung in Deutschland? Welche Möglichkeiten gibt es, wenn die Impfung für einen Auslandsaufenthalt gefordert wird?* 2018 06.06.2021]; Available from: <https://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/Tuberkulose/FAQ01.html>.
36. Kaufmann, S.H., G. Hussey, and P.H. Lambert, *New vaccines for tuberculosis*. Lancet, 2010. 375(9731): p. 2110-9.
37. von Reyn, C.F., *Correcting the record on BCG before we license new vaccines against tuberculosis*. J R Soc Med, 2017. 110(11): p. 428-433.
38. Nemes, E., et al., *Prevention of M. tuberculosis Infection with H4:IC31 Vaccine or BCG Revaccination*. N Engl J Med, 2018. 379(2): p. 138-149.
39. Tait, D.R., et al., *Final Analysis of a Trial of M72/AS01(E) Vaccine to Prevent Tuberculosis*. N Engl J Med, 2019. 381(25): p. 2429-2439.
40. World Health Organization. *WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 4: Treatment - Drug-susceptible tuberculosis treatment*. 2022 12.11.2023]; Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/353829/9789240048126-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
41. Dheda, K., C.E. Barry, 3rd, and G. Maartens, *Tuberculosis*. Lancet, 2016. 387(10024): p. 1211-26.
42. Ekramnia, M., et al., *Estimated rates of progression to tuberculosis disease for persons infected with Mycobacterium tuberculosis in the United States*. Epidemiology, 2024. 35(2): p. 164-173.
43. Sester, M., et al., *Tuberculin skin testing underestimates a high prevalence of latent tuberculosis infection in hemodialysis patients*. Kidney Int, 2004. 65(5): p. 1826-34.
44. Guelar, A., et al., *A prospective study of the risk of tuberculosis among HIV-infected patients*. Aids, 1993. 7(10): p. 1345-9.

45. Antonucci, G., et al., *Risk factors for tuberculosis in HIV-infected persons. A prospective cohort study. The Gruppo Italiano di Studio Tubercolosi e AIDS (GISTA)*. *Jama*, 1995. 274(2): p. 143-8.
46. Tverdal, A., *Body mass index and incidence of tuberculosis*. *Eur J Respir Dis*, 1986. 69(5): p. 355-62.
47. Lönnroth, K., et al., *Alcohol use as a risk factor for tuberculosis - a systematic review*. *BMC Public Health*, 2008. 8: p. 289.
48. Deiss, R.G., T.C. Rodwell, and R.S. Garfein, *Tuberculosis and illicit drug use: review and update*. *Clin Infect Dis*, 2009. 48(1): p. 72-82.
49. Lichtenstein, I.H. and R.R. MacGregor, *Mycobacterial infections in renal transplant recipients: report of five cases and review of the literature*. *Rev Infect Dis*, 1983. 5(2): p. 216-26.
50. Muñoz, P., et al., *Tuberculosis in heart transplant recipients*. *Clin Infect Dis*, 1995. 21(2): p. 398-402.
51. Cowie, R.L., *The epidemiology of tuberculosis in gold miners with silicosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994. 150(5 Pt 1): p. 1460-2.
52. Jeon, C.Y. and M.B. Murray, *Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 13 observational studies*. *PLoS Med*, 2008. 5(7): p. e152.
53. Chou, K.J., et al., *Tuberculosis in maintenance dialysis patients*. *Nephron*, 2001. 88(2): p. 138-43.
54. Hussein, M.M., J.M. Mooij, and H. Roujoleh, *Tuberculosis and chronic renal disease*. *Semin Dial*, 2003. 16(1): p. 38-44.
55. El Amrani, M., et al., *Tuberculosis in hemodialysis*. *Med Sante Trop*, 2016. 26(3): p. 262-266.
56. Girndt, M., et al., *Impaired cellular immune function in patients with end-stage renal failure*. *Nephrol Dial Transplant*, 1999. 14(12): p. 2807-10.
57. Girndt, M., et al., *Molecular aspects of T- and B-cell function in uremia*. *Kidney Int Suppl*, 2001. 78: p. S206-11.
58. Wilkinson, R.J., et al., *Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study*. *Lancet*, 2000. 355(9204): p. 618-21.
59. Fauci, A.S. and D.C. Dale, *The effect of in vivo hydrocortisone on subpopulations of human lymphocytes*. *J Clin Invest*, 1974. 53(1): p. 240-6.
60. Boumpas, D.T., et al., *Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates*. *Ann Intern Med*, 1993. 119(12): p. 1198-208.
61. Jick, S.S., et al., *Glucocorticoid use, other associated factors, and the risk of tuberculosis*. *Arthritis Rheum*, 2006. 55(1): p. 19-26.
62. Shrestha, B.M., *Two Decades of Tacrolimus in Renal Transplant: Basic Science and Clinical Evidences*. *Exp Clin Transplant*, 2017. 15(1): p. 1-9.
63. Hardinger, K.L., M.J. Koch, and D.C. Brennan, *Current and future immunosuppressive strategies in renal transplantation*. *Pharmacotherapy*, 2004. 24(9): p. 1159-76.
64. Benvenuto, L.J., M.R. Anderson, and S.M. Arcasoy, *New frontiers in immunosuppression*. *J Thorac Dis*, 2018. 10(5): p. 3141-3155.
65. Liu, J., et al., *The risk factors for tuberculosis in liver or kidney transplant recipients*. *BMC Infectious Diseases*, 2014. 14(1): p. 387.
66. Torre-Cisneros, J., et al., *Tuberculosis after solid-organ transplant: incidence, risk factors, and clinical characteristics in the RESITRA (Spanish Network of Infection in Transplantation) cohort*. *Clin Infect Dis*, 2009. 48(12): p. 1657-65.
67. (CDC), C.f.D.C.a.P., *Recommendations for use of an isoniazid-rifapentine regimen with direct observation to treat latent Mycobacterium tuberculosis infection*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2011. 60(48): p. 1650-3.
68. Subramanian, A.K. and M.I. Morris, *Mycobacterium tuberculosis infections in solid organ transplantation*. *Am J Transplant*, 2013. 13 Suppl 4: p. 68-76.
69. Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Hämatopoetische Stammzelltransplantation und Zelluläre Therapie e. V. *Leitlinie zur allogenen SCT, Kapitel 7 Konditionierung*. 2016 06.06.2021]; Available from: https://www.dag-kbt.de/files/downloads/Leitlinien_Kap-07_Konditionierung.pdf.

70. Akan, H., O. Arslan, and O.A. Akan, *Tuberculosis in stem cell transplant patients*. J Hosp Infect, 2006. 62(4): p. 421-6.
71. Agrawal, N., et al., *Incidence and clinical profile of tuberculosis after allogeneic stem cell transplantation*. Transpl Infect Dis, 2018. 20(1).
72. Akı Ş, Z., et al., *The incidence of tuberculosis infection in hematopoietic stem cell transplantation recipients: A retrospective cohort study from a center in Turkey*. Transpl Infect Dis, 2018. 20(4): p. e12912.
73. Roy, V. and D. Weisdorf, *Mycobacterial infections following bone marrow transplantation: a 20 year retrospective review*. Bone Marrow Transplant, 1997. 19(5): p. 467-70.
74. Carmona, L., et al., *Increased risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2003. 30(7): p. 1436-9.
75. Askling, J., et al., *Risk and case characteristics of tuberculosis in rheumatoid arthritis associated with tumor necrosis factor antagonists in Sweden*. Arthritis Rheum, 2005. 52(7): p. 1986-92.
76. Arkema, E.V., et al., *Are patients with rheumatoid arthritis still at an increased risk of tuberculosis and what is the role of biological treatments?* Ann Rheum Dis, 2015. 74(6): p. 1212-7.
77. Gómez-Reino, J.J., et al., *Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report*. Arthritis Rheum, 2003. 48(8): p. 2122-7.
78. Winthrop, K.L., et al., *Mycobacterial diseases and antitumour necrosis factor therapy in USA*. Ann Rheum Dis, 2013. 72(1): p. 37-42.
79. Dixon, W.G., et al., *Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR)*. Ann Rheum Dis, 2010. 69(3): p. 522-8.
80. Brassard, P., A. Kezouh, and S. Suissa, *Antirheumatic drugs and the risk of tuberculosis*. Clin Infect Dis, 2006. 43(6): p. 717-22.
81. Brassard, P., et al., *Rheumatoid arthritis, its treatments, and the risk of tuberculosis in Quebec, Canada*. Arthritis Rheum, 2009. 61(3): p. 300-4.
82. Carmona, L., et al., *Effectiveness of recommendations to prevent reactivation of latent tuberculosis infection in patients treated with tumor necrosis factor antagonists*. Arthritis Rheum, 2005. 52(6): p. 1766-72.
83. Lewinsohn, D.M., et al., *Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: Diagnosis of Tuberculosis in Adults and Children*. Clin Infect Dis, 2017. 64(2): p. e1-e33.
84. Steingart, K.R., et al., *Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review*. Lancet Infect Dis, 2006. 6(9): p. 570-81.
85. Chou, P.C., et al., *Nucleic acid amplification test and bronchoscopy improve the diagnostic accuracy of smear-negative tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis, 2012. 16(12): p. 1674-9.
86. Bourgi, K., et al., *Clinical Impact of Nucleic Acid Amplification Testing in the Diagnosis of Mycobacterium Tuberculosis: A 10-Year Longitudinal Study*. Open Forum Infect Dis, 2017. 4(2): p. ofx045.
87. Dorman, S.E., et al., *Xpert MTB/RIF Ultra for detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study*. Lancet Infect Dis, 2018. 18(1): p. 76-84.
88. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2020*. 2021 [11.04.2021]; Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf>.
89. Sester, U., et al., *Whole-blood flow-cytometric analysis of antigen-specific CD4 T-cell cytokine profiles distinguishes active tuberculosis from non-active states*. PLoS One, 2011. 6(3): p. e17813.
90. Sester, M., et al., *Interferon- γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis*. Eur Respir J, 2011. 37(1): p. 100-11.
91. Shingadia, D. and V. Novelli, *The tuberculin skin test: a hundred, not out?* Arch Dis Child, 2008. 93(3): p. 189-90.

92. Cho, Y.S., et al., *Deciphering the proteome of the in vivo diagnostic reagent "purified protein derivative" from Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics*, 2012. 12(7): p. 979-91.
93. Mack, U., et al., *LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to M. tuberculosis? A TBNET consensus statement*. *Eur Respir J*, 2009. 33(5): p. 956-73.
94. Farhat, M., et al., *False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria?* *Int J Tuberc Lung Dis*, 2006. 10(11): p. 1192-204.
95. Mancuso, J.D., et al., *The Long-term Effect of Bacille Calmette-Guérin Vaccination on Tuberculin Skin Testing: A 55-Year Follow-Up Study*. *Chest*, 2017. 152(2): p. 282-294.
96. Sester, U., et al., *Improved efficiency in detecting cellular immunity towards M. tuberculosis in patients receiving immunosuppressive drug therapy*. *Nephrol Dial Transplant*, 2006. 21(11): p. 3258-68.
97. Richeldi, L., et al., *Performance of tests for latent tuberculosis in different groups of immunocompromised patients*. *Chest*, 2009. 136(1): p. 198-204.
98. Petrucci, R., et al., *Quantiferon-TB Gold In-Tube Improves Tuberculosis Diagnosis in Children*. *Pediatr Infect Dis J*, 2017. 36(1): p. 44-49.
99. Andersen, P., et al., *Specific immune-based diagnosis of tuberculosis*. *Lancet*, 2000. 356(9235): p. 1099-104.
100. Pai, M. and M. Behr, *Latent Mycobacterium tuberculosis Infection and Interferon-Gamma Release Assays*. *Microbiol Spectr*, 2016. 4(5).
101. Ewer, K., et al., *Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in a school tuberculosis outbreak*. *Lancet*, 2003. 361(9364): p. 1168-73.
102. Ferrara, G., et al., *Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with Mycobacterium tuberculosis: a prospective study*. *Lancet*, 2006. 367(9519): p. 1328-34.
103. Adams, L.V., R.D. Waddell, and C.F. Von Reyn, *T-SPOT.TB Test(R) results in adults with Mycobacterium avium complex pulmonary disease*. *Scand J Infect Dis*, 2008. 40(3): p. 196-203.
104. T-SPOT.TB. *The T-SPOT.TB test technology*. 2021 06.06.2021]; Available from: <https://www.tspot.com/why-the-t-spot-tb-test/technology/>.
105. QIAGEN. *Quantiferon®-TB Gold (QFT®) ELISA Package Insert*. 2017 06.06.2021]; Available from: https://www.quantiferon.com/wp-content/uploads/2018/03/L1075115_QFT_EU_ROW_Rev005.pdf.
106. Pai, M., A. Zwerling, and D. Menzies, *Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update*. *Ann Intern Med*, 2008. 149(3): p. 177-84.
107. Diel, R., et al., *Interferon-γ release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis*. *Eur Respir J*, 2011. 37(1): p. 88-99.
108. Cattamanchi, A., et al., *Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection in HIV-infected individuals: a systematic review and meta-analysis*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2011. 56(3): p. 230-8.
109. Kang, W.L., et al., *Interferon-Gamma Release Assay is Not Appropriate for the Diagnosis of Active Tuberculosis in High-Burden Tuberculosis Settings: A Retrospective Multicenter Investigation*. *Chin Med J (Engl)*, 2018. 131(3): p. 268-275.
110. Bergstedt, W., et al., *First-in-man open clinical trial of a combined rESAT-6 and rCFP-10 tuberculosis specific skin test reagent*. *PLoS One*, 2010. 5(6): p. e11277.
111. Ruhwald, M., et al., *Safety and efficacy of the C-Tb skin test to diagnose Mycobacterium tuberculosis infection, compared with an interferon γ release assay and the tuberculin skin test: a phase 3, double-blind, randomised, controlled trial*. *Lancet Respir Med*, 2017. 5(4): p. 259-268.
112. Hoff, S.T., et al., *Sensitivity of C-Tb: a novel RD-1-specific skin test for the diagnosis of tuberculosis infection*. *Eur Respir J*, 2016. 47(3): p. 919-28.
113. Rozot, V., et al., *Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease*. *Eur J Immunol*, 2013. 43(6): p. 1568-77.

114. QIAGEN. *Detect TB infection with confidence*. 2017 [06.06.2021]; Available from: https://www.quantiferon.com/wp-content/uploads/2017/10/PROM-11186-001_1107785_BRO_QFT-Plus_GeneralSales_0717_US.pdf.
115. Perfetto, S.P., P.K. Chattopadhyay, and M. Roederer, *Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(8): p. 648-55.
116. Metcalfe, J.Z., et al., *Test variability of the QuantiFERON-TB gold in-tube assay in clinical practice*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013. 187(2): p. 206-11.
117. Barcellini, L., et al., *First evaluation of QuantiFERON-TB Gold Plus performance in contact screening*. *Eur Respir J*, 2016. 48(5): p. 1411-1419.
118. Sester, M., et al., *Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation*. *Transplantation*, 2001. 71(9): p. 1287-94.
119. Houben, R.M. and P.J. Dodd, *The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling*. *PLoS Med*, 2016. 13(10): p. e1002152.
120. Nikolova, M., et al., *Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of Mycobacterium tuberculosis infection*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013. 75(3): p. 277-81.
121. Barcellini, L., et al., *First independent evaluation of QuantiFERON-TB Plus performance*. *Eur Respir J*, 2016. 47(5): p. 1587-90.
122. Chiacchio, T., et al., *Characterization of QuantiFERON-TB-Plus results in latent tuberculosis infected patients with or without immune-mediated inflammatory diseases*. *Journal of Infection*, 2019. 79(1): p. 15-23.
123. Sester, M., et al., *Risk assessment of tuberculosis in immunocompromised patients. A TBNET study*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014. 190(10): p. 1168-76.
124. Grant, J., et al., *Interferon-gamma release assays are a better tuberculosis screening test for hemodialysis patients: A study and review of the literature*. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2012. 23(3): p. 114-6.
125. Ryu, M.R., et al., *Comparative Evaluation of QuantiFERON-TB Gold In-Tube and QuantiFERON-TB Gold Plus in Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in Immunocompromised Patients*. *J Clin Microbiol*, 2018. 56(11).
126. Venkatappa, T.K., et al., *Comparing QuantiFERON-TB Gold Plus with Other Tests To Diagnose Mycobacterium tuberculosis Infection*. *J Clin Microbiol*, 2019. 57(11).
127. Igari, H., et al., *Positivity rate of interferon- γ release assays for estimating the prevalence of latent tuberculosis infection in renal transplant recipients in Japan*. *J Infect Chemother*, 2019. 25(7): p. 537-542.
128. Telisinghe, L., et al., *The sensitivity of the QuantiFERON(®)-TB Gold Plus assay in Zambian adults with active tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2017. 21(6): p. 690-696.
129. Igari, H., et al., *Lymphocyte subset analysis in QuantiFERON-TB Gold Plus and T-Spot.TB for latent tuberculosis infection in rheumatoid arthritis*. *J Infect Chemother*, 2018. 24(2): p. 110-116.
130. Pieterman, E.D., et al., *A multicentre verification study of the QuantiFERON(®)-TB Gold Plus assay*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2018. 108: p. 136-142.
131. Theel, E.S., et al., *Comparison of the QuantiFERON-TB Gold Plus and QuantiFERON-TB Gold In-Tube Interferon Gamma Release Assays in Patients at Risk for Tuberculosis and in Health Care Workers*. *J Clin Microbiol*, 2018. 56(7).
132. Kim, S.H., K.W. Jo, and T.S. Shim, *QuantiFERON-TB Gold PLUS versus QuantiFERON-TB Gold In-Tube test for diagnosing tuberculosis infection*. *Korean J Intern Med*, 2020. 35(2): p. 383-391.
133. Zhang, H., et al., *Serial testing of Mycobacterium tuberculosis infection in Chinese village doctors by QuantiFERON-TB Gold Plus, QuantiFERON-TB Gold in-Tube and T-SPOT.TB*. *J Infect*, 2019. 78(4): p. 305-310.
134. Moon, H.W., et al., *Evaluation of QuantiFERON-TB Gold-Plus in Health Care Workers in a Low-Incidence Setting*. *J Clin Microbiol*, 2017. 55(6): p. 1650-1657.
135. Tsuyuzaki, M., et al., *Role of CD8 T-cell in immune response to tuberculosis-specific antigen in QuantiFERON-TB Gold Plus*. *J Infect Chemother*, 2020. 26(6): p. 570-574.

136. Petruccioli, E., et al., *First characterization of the CD4 and CD8 T-cell responses to QuantiFERON-TB Plus*. J Infect, 2016. 73(6): p. 588-597.
137. Petruccioli, E., et al., *Analytical evaluation of QuantiFERON- Plus and QuantiFERON- Gold In-tube assays in subjects with or without tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2017. 106: p. 38-43.
138. Horne, D.J., et al., *Multicenter study of QuantiFERON(®)-TB Gold Plus in patients with active tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis, 2018. 22(6): p. 617-621.
139. Tsuyuzaki, M., et al., *Variation in interferon- γ production between QFT-Plus and QFT-GIT assays in TB contact investigation*. Respir Investig, 2019. 57(6): p. 561-565.
140. Rozot, V., et al., *Combined use of Mycobacterium tuberculosis-specific CD4 and CD8 T-cell responses is a powerful diagnostic tool of active tuberculosis*. Clin Infect Dis, 2015. 60(3): p. 432-7.
141. Lin, P.L. and J.L. Flynn, *CD8 T cells and Mycobacterium tuberculosis infection*. Semin Immunopathol, 2015. 37(3): p. 239-49.
142. Knierer, J., et al., *QFT-Plus: a plus in variability? - Evaluation of new generation IGRA in serial testing of students with a migration background in Germany*. J Occup Med Toxicol, 2017. 12: p. 1.
143. Uwamino, Y., et al., *Effect of refrigeration of blood samples in lithium-heparin tubes on QuantiFERON TB Gold Plus test result*. J Infect Chemother, 2020. 26(3): p. 312-314.
144. Cornaby, C., C.K. Giardina, and J.L. Schmitz, *Repeatability of QuantiFERON-TB gold plus testing utilizing microparticle chemiluminescence*. J Immunol Methods, 2022. 509: p. 113340.
145. Nemes, E., et al., *Optimization and Interpretation of Serial QuantiFERON Testing to Measure Acquisition of Mycobacterium tuberculosis Infection*. Am J Respir Crit Care Med, 2017. 196(5): p. 638-648.
146. Lee, M.R., et al., *CD8 response measured by QuantiFERON-TB Gold Plus and tuberculosis disease status*. J Infect, 2019. 78(4): p. 299-304.
147. Silva, D.R., et al., *Risk factors for tuberculosis: diabetes, smoking, alcohol use, and the use of other drugs*. J Bras Pneumol, 2018. 44(2): p. 145-152.
148. Workneh, M.H., G.A. Bjune, and S.A. Yimer, *Prevalence and associated factors of tuberculosis and diabetes mellitus comorbidity: A systematic review*. PLoS One, 2017. 12(4): p. e0175925.
149. Aabye, M.G., et al., *Negative effect of smoking on the performance of the QuantiFERON TB gold in tube test*. BMC Infect Dis, 2012. 12: p. 379.
150. Horton, K.C., et al., *Sex Differences in Tuberculosis Burden and Notifications in Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review and Meta-analysis*. PLoS Med, 2016. 13(9): p. e1002119.
151. He, G., et al., *The Prevalence and Incidence of Latent Tuberculosis Infection and Its Associated Factors among Village Doctors in China*. PLoS One, 2015. 10(5): p. e0124097.
152. Sabri, A., et al., *Prevalence and risk factors for latent tuberculosis infection among healthcare workers in Morocco*. PLoS One, 2019. 14(8): p. e0221081.
153. Kim, S.Y., et al., *Tuberculin skin test and boosted reactions among newly employed healthcare workers: an observational study*. PLoS One, 2013. 8(5): p. e64563.
154. Johnson, P.D., et al., *Tuberculin-purified protein derivative-, MPT-64-, and ESAT-6-stimulated gamma interferon responses in medical students before and after Mycobacterium bovis BCG vaccination and in patients with tuberculosis*. Clin Diagn Lab Immunol, 1999. 6(6): p. 934-7.
155. Wang, L., et al., *A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guérin vaccination on tuberculin skin test measurements*. Thorax, 2002. 57(9): p. 804-9.
156. Sauzullo, I., et al., *Diagnostic performance in active TB of QFT-Plus assay and co-expression of CD25/CD134 in response to new antigens of Mycobacterium tuberculosis*. Med Microbiol Immunol, 2019. 208(2): p. 171-183.
157. Shafeque, A., et al., *Fourth-Generation QuantiFERON-TB Gold Plus: What Is the Evidence?* J Clin Microbiol, 2020. 58(9).
158. Zhang, Y., et al., *Comparing the diagnostic performance of QuantiFERON-TB Gold Plus with QFT-GIT, T-SPOT.TB and TST: a systematic review and meta-analysis*. BMC Infect Dis, 2023. 23(1): p. 40.

159. Sotgiu, G., et al., *QuantiFERON TB Gold Plus for the diagnosis of tuberculosis: a systematic review and meta-analysis*. J Infect, 2019. 79(5): p. 444-453.
160. Oh, C.E., et al., *Comparing the Diagnostic Performance of QFT-Plus to Other Tests of Latent Tuberculosis Infection: A Systematic Review and Meta-analysis*. Clin Infect Dis, 2020.
161. Zhou, G., et al., *Interferon- γ release assays or tuberculin skin test for detection and management of latent tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Infect Dis, 2020. 20(12): p. 1457-1469.
162. Pérez-Recio, S., et al., *Identification of Recent Tuberculosis Exposure Using QuantiFERON-TB Gold Plus, a Multicenter Study*. Microbiol Spectr, 2021. 9(3): p. e0097221.
163. Gupta, R.K., et al., *Evaluation of QuantiFERON-TB Gold Plus for Predicting Incident Tuberculosis among Recent Contacts: A Prospective Cohort Study*. Ann Am Thorac Soc, 2020. 17(5): p. 646-650.
164. Viana Machado, F., et al., *Evaluation of CD8(+) response in QuantiFERON-TB Gold Plus as a marker of recent infection*. Respir Med, 2021. 185: p. 106508.
165. Yi, L., et al., *Evaluation of QuantiFERON-TB Gold Plus for Detection of Mycobacterium tuberculosis infection in Japan*. Sci Rep, 2016. 6: p. 30617.
166. Hong, J.Y., et al., *Comparison of QFT-Plus and QFT-GIT tests for diagnosis of M. tuberculosis infection in immunocompetent Korean subjects*. J Thorac Dis, 2019. 11(12): p. 5210-5217.
167. Cosmi, L., et al., *Detection by flow cytometry of ESAT-6- and PPD-specific circulating CD4+ T lymphocytes as a diagnostic tool for tuberculosis*. Int Arch Allergy Immunol, 2007. 143(1): p. 1-9.
168. Rovina, N., et al., *Immune response to mycobacterial infection: lessons from flow cytometry*. Clin Dev Immunol, 2013. 2013: p. 464039.
169. Papageorgiou, C.V., et al., *Flow cytometry analysis of CD4+IFN- γ + T-cells for the diagnosis of mycobacterium tuberculosis infection*. Cytometry B Clin Cytom, 2016. 90(3): p. 303-11.
170. Kiecker, F., et al., *Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides--what kind of peptide for which purpose?* Hum Immunol, 2004. 65(5): p. 523-36.
171. Petruccioli, E., et al., *Effect of HIV-infection on QuantiFERON-plus accuracy in patients with active tuberculosis and latent infection*. J Infect, 2020. 80(5): p. 536-546.
172. Jung, J., et al., *Is the New Interferon-Gamma Releasing Assay Beneficial for the Diagnosis of Latent and Active Mycobacterium tuberculosis Infections in Tertiary Care Setting?* J Clin Med, 2021. 10(7).
173. Suzukawa, M., et al., *Evaluation of cytokine levels using QuantiFERON-TB Gold Plus in patients with active tuberculosis*. J Infect, 2020. 80(5): p. 547-553.
174. Kamath, A.B., et al., *Cytolytic CD8+ T cells recognizing CFPI0 are recruited to the lung after Mycobacterium tuberculosis infection*. J Exp Med, 2004. 200(11): p. 1479-89.
175. Lewinsohn, D.M., et al., *Classically restricted human CD8+ T lymphocytes derived from Mycobacterium tuberculosis-infected cells: definition of antigenic specificity*. J Immunol, 2001. 166(1): p. 439-46.
176. Shams, H., et al., *Characterization of a Mycobacterium tuberculosis peptide that is recognized by human CD4+ and CD8+ T cells in the context of multiple HLA alleles*. J Immunol, 2004. 173(3): p. 1966-77.
177. Lalvani, A., et al., *Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(1): p. 270-5.
178. Pathan, A.A., et al., *High frequencies of circulating IFN-gamma-secreting CD8 cytotoxic T cells specific for a novel MHC class I-restricted Mycobacterium tuberculosis epitope in M. tuberculosis-infected subjects without disease*. Eur J Immunol, 2000. 30(9): p. 2713-21.
179. Cardoso, F.L., et al., *T-cell responses to the Mycobacterium tuberculosis-specific antigen ESAT-6 in Brazilian tuberculosis patients*. Infect Immun, 2002. 70(12): p. 6707-14.
180. Moguche, A.O., et al., *Antigen Availability Shapes T Cell Differentiation and Function during Tuberculosis*. Cell Host Microbe, 2017. 21(6): p. 695-706.e5.
181. Vincenti, D., et al., *Identification of early secretory antigen target-6 epitopes for the immunodiagnosis of active tuberculosis*. Mol Med, 2003. 9(3-4): p. 105-11.
182. Rueda, C.M., et al., *Characterization of CD4 and CD8 T cells producing IFN- γ in human latent and active tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2010. 90(6): p. 346-53.

183. de la Cámara, R., et al., *Tuberculosis after hematopoietic stem cell transplantation: incidence, clinical characteristics and outcome. Spanish Group on Infectious Complications in Hematopoietic Transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2000. 26(3): p. 291-8.
184. Wolfe, F., et al., *Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy*. Arthritis Rheum, 2004. 50(2): p. 372-9.
185. Lange, B., et al., *Posttransplant tuberculosis in Europe – a TBnet study*. European Respiratory Journal, 2019. 54(suppl 63): p. OA3820.
186. Diatlova, A., et al., *Molecular Markers of Early Immune Response in Tuberculosis: Prospects of Application in Predictive Medicine*. Int J Mol Sci, 2023. 24(17).
187. Meier, J.P., et al., *Performance of T-Track(®) TB, a Novel Dual Marker RT-qPCR-Based Whole-Blood Test for Improved Detection of Active Tuberculosis*. Diagnostics (Basel), 2023. 13(4).
188. Zhang, L., et al., *Multiple cytokine analysis based on QuantiFERON-TB gold plus in different tuberculosis infection status: an exploratory study*. BMC Infect Dis, 2024. 24(1): p. 28.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Herstellung des IFN- γ -Standards	35
Abbildung 2. Plattenbelegung	36
Abbildung 3. Interpretation des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests	37
Abbildung 4. Gatingstrategie der Durchflusszytometrie von CD4-T-Zellen eines QuantiFERON-TB Gold Plus Test positiven Patienten mit dem Antigen SEB	43
Abbildung 5. Gatingstrategie der Durchflusszytometrie von CD8-T-Zellen eines QuantiFERON-TB Gold Plus Test positiven Patienten mit dem Antigen SEB	44
Abbildung 6. Darstellung der IFN- γ -Antworten [IU/ml] der einzelnen Probandengruppen pro Röhrchen	49
Abbildung 7. Darstellung der normierten IFN- γ -Antworten [IU/ml] der einzelnen Probandengruppen pro Röhrchen	50
Abbildung 8. TB-1- und TB-2-IFN- γ -Antwort der verschiedenen Patientengruppen im Vergleich.....	51
Abbildung 9. Direkte Vergleiche der TB-1- und TB-2-Antworten.....	52
Abbildung 10. Evaluation des QuantiFERON-TB Gold Plus Tests.....	54
Abbildung 11. Vergleichende Darstellung der IFN- γ -Expression der Probanden mit Ausnahme der aTB auf die Stimuli TB-1, TB-2 und PPD	56
Abbildung 12. Differenz des TB-2- und TB-1-Röhrchens in den Personengruppen mit latenter (n=43) und aktiver (n=11) Tuberkuloseinfektion.....	62
Abbildung 13. Prozentuale Anteile der reaktiven CD4-T-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung	63
Abbildung 14. Prozentuale Anteile der reaktiven CD8-T-Zellen in der durchflusszytometrischen Messung	64
Abbildung 15. Vergleich der reaktiven CD4- und CD8-T-Zellantworten auf die verschiedenen Stimuli	65
Abbildung 16. Korrelationen zwischen den verschiedenen Stimuli der FACS-Analyse und dem QuantiFERON-TB Gold Plus Test.....	67
Abbildung 17. Vergleich der prozentualen Anteile der reaktiven CD4-IFN- γ -T-Zellen auf verschiedene Stimuli bei Patienten mit positivem QuantiFERON-TB Gold Plus Test	71
Abbildung 18. Vergleich der prozentualen Anteile der reaktiven CD8-IFN- γ -T-Zellen auf verschiedene Stimuli bei Patienten mit positivem QuantiFERON-TB Gold Plus Test	73

Abbildung 19. Vergleich der durchflusszytometrisch gemessenen IFN- γ -Antworten der prozentualen Anteile der reaktiven CD4- und CD8-T-Zellen auf die Stimuli TB-1 und TB-2 mit Einteilung der Patienten in die Gruppen der QuantiFERON-TB Gold Plus Test negativen und latenten Probanden sowie aTB.....	75
Abbildung 20. Vergleich der IFN- γ -Antworten der prozentualen Anteile der reaktiven CD4- und CD8-T-Zellen auf die Stimuli ESAT-6 und CFP-10 mit der Einteilung der Patienten in die Gruppen der QuantiFERON-TB Gold Plus Test negativen und latenten Probanden sowie aTB.....	76
Abbildung 21. Interindividuelle Darstellung der reaktiven CD4- und CD8-T-Zell-Antworten der einzelnen Probanden auf die unterschiedlichen Stimuli.....	78

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Ein- und Ausschlusskriterien.....	29
Tabelle 2. Geräte und Materialien.....	30
Tabelle 3. Inhalt des QuantiFERON-TB Gold Plus ELISA-Kits von Qiagen.....	31
Tabelle 4. Chemikalien.....	31
Tabelle 5. Puffer und Medien.....	32
Tabelle 6. Antigene und costimulatorische Antikörper.....	32
Tabelle 7. Antikörper mit gekoppelten Fluorochromen.....	33
Tabelle 8. Antikörpermengen des Färbeansatzes mit gekoppelten Fluorochromen.....	41
Tabelle 9. Überblick über das Patientenkollektiv.....	46
Tabelle 10. Überblick QuantiFERON-TB Gold Plus Ergebnisse.....	47
Tabelle 11. Vierfeldertafel der TB-1- und TB-2-Ergebnisse.....	53
Tabelle 12. QuantiFERON vs. PPD.....	56
Tabelle 13. Logistische Regression für PPD-Ergebnisse.....	58
Tabelle 14. Logistische Regression für ELISA-Ergebnisse (QuantiFERON-TB Gold Plus).....	60
Tabelle 15. Vierfeldertafel der QuantiFERON-TB Gold Plus Ergebnisse im Vergleich zu den durchflusszytometrischen TB-1- und TB-2-Ergebnissen.....	69
Tabelle 16. Vierfeldertafel der QuantiFERON-TB Gold Plus Ergebnisse im Vergleich zu den durchflusszytometrischen Ergebnissen der Summe aus ESAT-6 und CFP-10.....	69
Tabelle 17. Vierfeldertafel der durchflusszytometrischen TB-1-Ergebnisse im Vergleich zur Summe aus ESAT-6 und CFP-10.....	69
Tabelle 18. Vierfeldertafel der durchflusszytometrischen TB-2-Ergebnisse im Vergleich zur Summe aus ESAT-6 und CFP-10.....	70
Tabelle 19. Vierfeldertafel der durchflusszytometrischen TB-1- und TB-2-Ergebnisse im Vergleich zur Summe aus ESAT-6 und CFP-10.....	70
Tabelle 20. <i>Follow-up</i> -Daten.....	80

9 Publikationen

Diese Arbeit ist Teil von zwei großen europäischen Multicenterstudien, die im Zentrum in Homburg koordiniert und im Rahmen des TBnet (Tuberculosis network European Trialsgroup) durchgeführt wurden. Publikationen sind wie folgt in Planung:

1. Sester, M., Andersen, A., Arias, M., Avasar, K., Bakken Kran, A.-M., Bothamley, G., Brown, J., Chesov, D., Ciobanu, N., Cirillo, D.M., Crudu, V., de Souza Galvao, M., Dilektasli, A.G., Dominguez, J., Duarte, R., Dyrhol Riise, A.M., Goletti, D., Gomez, N.A., Hoffmann, H., Ibraim, E., Kalsdorf, B., Krawczyk, M., Kunst, H., Lange, B., Lipman, M., Matteelli, A., Milkiewicz, P., Neyer, D., Nordholm, C., Oral, B., Palacios, J.J., Petruccioli, E., Raszeja-Wyszomirska, J., Ravn, P., Spohn, H.-E., Toader, C., Wagner, D., van Leth, F., Martinez, L., and Lange, C. 2023.
Performance of a new generation IGRA in immunocompromised individuals – a TBnet study.

Diese Studie wurde an 20 Standorten in 11 europäischen Ländern durchgeführt. Hierbei wurde der QuantiFERON-TB Gold Plus Test bei insgesamt 2653 Personen (1802 immunsupprimierten Patienten sowie 851 Kontrollpersonen) untersucht. Insgesamt wurden am Zentrum in Homburg 364 Patienten aus der vorliegenden Arbeit mit in die Gesamtkohorte eingeschlossen. Die Rekrutierungsphase ist in allen Zentren abgeschlossen und die Auswertung der Gesamtstudie erfolgt aktuell in Kollaboration mit dem Department of Epidemiology/Boston University of Public Health; USA.

2. Lange, B., Arend, S.M., Armbruster, C., Arias-Guillén, M., Bakker, M., Berastegui, C., Babiker, M., Charif, R., Duarte, R., Flick, H., Hofland, R.W., Ismail, J., Kniepeiss, D., Krishnan, N., Kuijpers, D., Kunst, H., Lange, C., Lezaic, V., Los-Arcos, I., Machova, J., Milburn, H., Kon, O.M., Osoro Suarez, C., Pesut, D., Rahman, A., Reischig, T., Sanchez Montalva, A., Spohn, H.-E., Stegenga, M.T., de Vries, A.P.J., Wagner, D., Wobser, R., Wong, L., and Sester, M. 2023.
Effect of individual screening and center tuberculosis risk management strategy on post-transplant tuberculosis incidence in Europe – a multicentric TBnet cohort study.

Diese Arbeit untersuchte an 15 Zentren aus 9 europäischen Ländern die Tuberkuloseinzidenz bei insgesamt 6357 transplantierten Patienten mindestens zwei Jahre nach Transplantation. Die Beobachtungsphase in allen Zentren ist abgeschlossen und die Auswertung der Daten erfolgt derzeit in Kollaboration mit dem Helmholtz Institut für Infektionsforschung in Braunschweig.

10 Danksagung

Ich bedanke mich vor allem bei Frau Prof. Dr. Martina Sester, dass ich diese Arbeit unter ihrer Leitung am Institut für Transplantations- und Infektionsimmunologie schreiben durfte. Ihr nicht ermüdendes Engagement im Bereich der Tuberkuloseforschung ist für mich inspirierend und motivierend zugleich. Neben ihrer Professionalität und ihrer Fachkompetenz bin ich von ihrer außergewöhnlichen Herzlichkeit beeindruckt. Vielen Dank für die unermüdliche Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Mein weiterer großer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Tina Schmidt, die jederzeit ein offenes Ohr und auch immer die richtige Antwort auf all meine Fragen hatte. Ohne diese Hilfe wäre die Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht möglich gewesen.

Besonders dankbar bin ich für die Hilfe und das freundschaftliche Miteinander des gesamten Teams. Vielen Dank an Candida Guckelmus, Stefanie Marx, Verena Klemis und Lisa Lieblang, dass ihr das Projekt und die Durchführung der ELISAS und des FACS mitgetragen habt. Ebenso möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. David Schub bedanken, der mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein weiterer Dank gilt den Kollaborationspartnern, ohne die niemals eine solche Anzahl an Probanden zustande gekommen wäre. Hier möchte ich besonders Herrn Prof. Dr. Assmann, Herrn PD Dr. Bittenbring, Herrn Dr. van Bentum, Frau Dr. Leyking und Frau Dr. Adam hervorheben.

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Sester, der mich überhaupt dazu gebracht hat, in die Tuberkuloseforschung einzusteigen und der bis zuletzt immer ein offenes Ohr hatte.

Natürlich wäre ohne die Probanden keine Arbeit zustande gekommen. Ich danke allen für die Mitarbeit und das entgegengebrachte Vertrauen.

Mein abschließender Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie, die mir, jeder auf seine Weise, stets behilflich waren und den Rücken freihielten. Ganz besonders gilt dieser Dank meinen Eltern, die mich in jeder Lebenslage bedingungslos unterstützen - ohne euch wäre das alles nicht möglich.

11 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 25.07.2024

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. M. D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. M. Sester

Univ.-Prof. Dr. med. D. Fliser