

Aus dem Forschungszentrum Borstel
Leibniz-Lungenzentrum
Medizinischer Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christoph Lange
Professor für Respiratory Medicine & International Health
der Universität zu Lübeck

Mycobacterial Growth Inhibition Assay als Korrelat des Immunschutzes nach *M. bovis* BCG-Impfung

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Universität zu Lübeck
– Sektion Medizin –

vorgelegt von
Juliane Radloff
geb. in Eisenach

Lübeck 2021

1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Barbara Kalsdorf
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. David Juhl
Tag der mündlichen Prüfung:	13.01.2021
Zum Druck genehmigt:	Lübeck, den 13.01.2021

I.	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
II.	Abbildungsverzeichnis.....	VII
III.	Tabellenverzeichnis.....	VIII
1	Einleitung	1
1.1	Tuberkulose	1
1.2	Erreger der Tuberkulose	2
1.2.1	Familie der Mykobakterien	2
1.2.2	Besonderheiten der Mykobakterien	2
1.2.3	Wachstumsverhalten der Mykobakterien	3
1.2.4	Pathogenese der Tuberkulose.....	3
1.3	Latente Infektion mit <i>M. tuberculosis</i>	4
1.4	Impfstoffe	5
1.4.1	Elimination der Tuberkulose	5
1.4.2	<i>M. bovis</i> BCG-Impfung.....	6
1.4.3	Aktuelle Impfstoffkandidaten	7
1.4.4	Surrogat-Markers für den protektiven Effekt	7
1.5	Der MGIA als Infektionsmodell	8
1.5.1	Kompartiment Lunge.....	9
2	Forschungsfragen.....	10
3	Methoden.....	11
3.1	Studiendesign.....	11
3.2	Probandenrekrutierung	12
3.2.1	Ein- und Ausschlusskriterien	12
3.2.2	Eignungsuntersuchungen	13
3.3	Der IGRA ELISpot	13
3.4	Zellaufbereitung	16
3.4.1	Bronchoalveoläre Lavage und BALC-Aufbereitung	16
3.4.2	Prinzip der PBMC-Isolierung.....	17
3.4.3	Zellzählung und Differenzierung	18
3.4.4	Durchführung der <i>M. bovis</i> BCG-Impfung.....	18
3.5	Der MGIA	19
3.5.1	Prinzip des MGIA	19

3.5.2	Herstellung der optimalen Infektionsdosis	20
3.5.3	Herstellung des Inokulums	21
3.5.4	Assayansatz	22
3.5.5	Vitamin D Versuch	23
3.5.6	Lyseversuch	23
3.5.7	Überführung des Ansatzes in Nährmedien	24
3.5.8	TTP im MGIT System.....	24
3.5.9	CFU auf Middlebrook-7H10-Agarplatten	25
3.6	Statistik.....	26
3.6.1	Fallzahlberechnung	26
3.6.2	Auswertung	26
4	Ergebnisse	28
4.1	Beschreibung der Probandenpopulation	28
4.1.1	<i>M. bovis</i> BCG-Impfung.....	30
4.2	Test Qualität.....	30
4.2.1	Ermittlung der optimalen Infektionsdosis.....	30
4.2.2	Zeiteffekt	32
4.3	TTP-Ergebnisse des MGIA.....	36
4.3.1	Effekt der Zellen in TTP.....	36
4.3.2	Effekt zwischen PBMC und BALC in TTP	37
4.3.3	Effekt der <i>M. bovis</i> BCG-Impfung in TTP	38
4.4	CFU-Ergebnisse des MGIA	40
4.4.1	Effekt der Zellen in CFU	40
4.4.2	Effekt zwischen PBMC und BALC in CFU	40
4.4.3	Effekt der <i>M. bovis</i> BCG-Impfung in CFU.....	41
4.5	Vitamin D als Positivkontrolle	42
4.6	Lyseversuche	45
4.6.1	Lyseversuch mit PBMC	45
4.6.2	Lyseversuch mit BALC.....	48
4.7	Differentialzytologie zwischen Blut und Lavage	50
4.8	IGRA ELISpot.....	51
4.8.1	IGRA und MGIA im Vergleich.....	53
5	Diskussion.....	56
5.1	Effekte auf das Wachstum von <i>M. tuberculosis ex vivo</i> im MGIA	56

5.1.1	Wachstumsunterschiede vor und nach <i>M. bovis</i> BCG-Impfung	56
5.1.2	Wachstumsunterschiede in PBMC und BALC.....	57
5.1.3	Korrelation zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und spezifischer Immunantwort.....	58
5.2	Anwendung des IGRA ELISpot in Klinik und Forschung	59
5.3	Funktionelle Wirkung von Vitamin D	60
5.4	Lyseversuche	61
5.5	Limitationen	62
5.6	Fazit	63
5.7	Ausblick	63
6	Zusammenfassung	65
7	Summary	66
8	Literaturverzeichnis	67
9	Anhang	80
9.1	BCG-Impfulzationen im zeitlichen Verlauf	80
9.2	Reagenzien, Lösungen und Medien	82
9.2.1	IGRA ELISpot	82
9.2.2	Zellaufbereitung	83
9.2.3	MGIA und Nährmedien	85
9.3	Kritische Einordnung der Methoden	87
9.3.1	Studiendesign	87
9.3.2	Test Qualität	87
9.3.3	Einschränkungen des MGIA.....	88
9.3.4	Die Multiplizität der Infektion	89
9.3.5	Interpretation der unterschiedlichen Kultivierungssysteme MGIT und CFU	90
9.3.6	Einschränkungen der Vitamin D - Versuche	91
	Ethikvotum	92
	Eidesstattliche Erklärung	93
	Danksagung.....	94
	Verzeichnis der eigenen Veröffentlichungen	95

I. Abkürzungsverzeichnis

a. dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
AS01_E	Adjuvanz System 01 _E (adjuvant Sysmtem 01 _E)
β	Schätzer, errechneter Faktor der Effekte in den linearen „mixed effects“ Modellen
BALC	bronchoalveolar lavage cells (Zellen der bronchoalveolären Lavage)
BCG	Bacillus Calmette-Guérin (<i>M. bovis</i> BCG Tuberkulose-Impfstamm)
CD	cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale auf Zellen)
CFP-10	culture filtrate protein 10 kDa (<i>M. tuberculosis</i> spezifisches Antigen)
CFU	colony forming unit (Koloniebildende Einheiten)
CI	confidence interval (Konfidenzintervall; Intervall zur Präzision der Lageschätzung eines Parameters)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISpot	enzyme-linked immunospot assay
ESAT-6	early secreted antigenic target 6 kDa (<i>M. tuberculosis</i> - spezifisches Antigen)
g	Erdbeschleunigung (9,80665 m/s ²)
G	gauge (Eichmaß für Kanülen)
HBSS	HANK's Balanced Salt Solution (Pufferlösung)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Pufferlösung)
HIV	human immunodeficiency virus (humanes Immundefizienzvirus)
IGRA	interferon-gamma release assay (Interferon-γ Freisetzungstest)
IFN-γ	interferon-gamma (Interferon gamma)
IL	Interleukin
IQR	interquartile range (Interquartilabstand, Streuungsmaß in der deskriptiven Statistik)
kDa	Kilodalton, Maßeinheit der Masse
KI	Konfidenzintervall (Intervall zur Präzision der Lageschätzung eines Parameters)

LTBI	latent infection with <i>M. tuberculosis</i> (latente Infektion mit <i>M. tuberculosis</i>)
M72	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> Fusionsprotein 72
MDR-TB	multidrug-resistant tuberculosis (multiresistente Tuberkulose)
MGIA	mycobacterial growth inhibition assay (Assay zur Ermittlung der mykobakteriellen Wachstumshehmung)
MGIT	mycobacterial growth indicator tube (Flüssignährmedium zur Anzucht von Mykobakterien)
MOI	multiplicity of infection (Multiplizität der Infektion angegeben als Bakterienanzahl pro Zellzahl)
MTB	<i>Mycobacterium</i> (M.) <i>tuberculosis</i>
MVA85A	modified vaccinia Ankara expressing antigen 85A (modifiers Ankara Virus, das Antigen 85A experiment, ein Tuberkulose Impfstoffkandidat)
n	number (Anzahl/ Fallzahl)
NTM	Non-tuberculous mycobacteria (Nicht-tuberkulöse Mykobakterien)
OADC	Oleic acid Albumin Dextrose Catalase (Ölsäure-Albumin-Dextrose-Katalase-Supplement)
PANTA	Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixic acid, Trimethoprim, Azlocillin (Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim, Azlocillin)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (periphere, mononukleäre Blutzellen)
PBS	Phosphate Buffered Saline Solution (Phosphat gepufferte Lösung)
PPD	Purified Protein Derivate (Kulturfiltrat mykobakterieller Spezies)
p-Wert	probability (Signifikanzwert)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute der Zentrifuge)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturlösung)
SFC	spot-forming-cell (Punktbildende Zelle im ELISpot)
T0/ T4	Timepoint day 0 or day 4 (Zeitpunkt Tag Null bzw. Tag Vier)
TB	tuberculosis (Tuberkulose)
THT	Tuberkulin Hauttest
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α

TTP	time to culture positivity (Zeit bis zur Kulturpositivität)
V	Verdünnung/ Verdünnungsstufe
Vit. D	Vitamin D ₃ (1 α , 25 (OH) ₂ Cholecalciferol)
w/o	without (ohne)
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Studiendesign und zeitliche Abfolge der Untersuchungen	11
Abbildung 2 – Prinzip des enzyme-linked immunospot assay (ELISpot)	15
Abbildung 3 – BALC eines Rauchers	16
Abbildung 4 – Prinzip der PBMC-Isolierung mittels Dichtezentrifugation	17
Abbildung 5 – Schema der Assay-Ansätze im MGIA.....	19
Abbildung 6 - Assay-Ansatz in Zellkulturplatte.....	22
Abbildung 7 – Flussdiagramm der Probandenrekrutierungen und der Untersuchungen	29
Abbildung 8 – Kalibrationskurve der Wachstumsdauer von <i>M. tuberculosis</i> in TTP zu CFU	31
Abbildung 9 – Korrelation von Wachstumsdauer zu Konzentration von <i>M. tuberculosis</i> im MGIT33	
Abbildung 10 – Korrelation der Wachstumsdauer von <i>M. tuberculosis</i> in CFU zu TTP	34
Abbildung 11 – Effekt des Inokulum auf die Messwerte in TTP	35
Abbildung 12 – Effekt des Inokulum auf die Messwerte in Log ₁₀ CFU	36
Abbildung 13 – Effekt der <i>M. bovis</i> BCG-Impfung in TTP	39
Abbildung 14 – Effekt der <i>M. bovis</i> BCG-Impfung in Log ₁₀ CFU.....	42
Abbildung 15 – Effekt von Vitamin D in PBMC und BALC in TTP	43
Abbildung 16 – Effekt von Vitamin D in PBMC und BALC in Log ₁₀ CFU	44
Abbildung 17 – Effekt der Zellvitalität in PBMC in TTP	46
Abbildung 18 – Effekt der Zellvitalität in PBMC in Log ₁₀ CFU	47
Abbildung 19 – Effekt der Zellvitalität in BALC in TTP	48
Abbildung 20 – Effekt der Zellvitalität in BALC in Log ₁₀ CFU	50
Abbildung 21 – PPD-Immunantwort vor und nach <i>M. bovis</i> BCG-Impfung in PBMC.....	53
Abbildung 22 – Korrelation zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und <i>M. tuberculosis</i> -spezifischer Immunantwort	55

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Beschreibung der Probandenpopulation	28
Tabelle 2 – Messwerte der Kalibrationskurve des Wachstums von <i>M. tuberculosis</i> in TTP	30
Tabelle 3 – Die Abhängigkeit der Wachstumsdauer von <i>M. tuberculosis</i> in TTP	33
Tabelle 4 – Effekt der Zellgruppen vor und nach <i>M. bovis</i> BCG-Impfung in TTP.....	37
Tabelle 5 – Effekt der <i>M. bovis</i> BCG-Impfung verglichen nach Zellgruppen in TTP	38
Tabelle 6 – Effekt der <i>M. bovis</i> BCG-Impfung auf PBMC und BALC in TTP.....	38
Tabelle 7 – Effekt der <i>M. bovis</i> BCG-Impfung verglichen nach PBMC und BALC in Log ₁₀ CFU	40
Tabelle 8 – Effekt der <i>M. bovis</i> BCG-Impfung verglichen nach PBMC und BALC in Log ₁₀ CFU	41
Tabelle 9 – Effekt der PBMC und BALC verglichen nach Impfstatus in Log ₁₀ CFU	41
Tabelle 10 – Effekt von Vitamin D in PBMC und BALC in TTP.....	43
Tabelle 11 – Effekt von Vitamin D in PBMC und BALC in Log ₁₀ CFU	44
Tabelle 12 – Effekt der Zellvitalität in PBMC in TTP.....	45
Tabelle 13 – Effekt der Zellvitalität in PBMC in Log ₁₀ CFU	47
Tabelle 14 – Effekt der Zellvitalität in BALC in TTP	48
Tabelle 15 – Effekt der Zellvitalität in BALC in Log ₁₀ CFU.....	49
Tabelle 16 – Effekt der <i>M. bovis</i> BCG-Impfung auf die Zelldifferenzierung der BALC.....	51
Tabelle 17 – Effekt der <i>M. bovis</i> BCG-Impfung auf die PPD-Immunantwort im IGRA ELISpot.....	52

1 Einleitung

1.1 Tuberkulose

Tuberkulose ist die am häufigsten zum Tode führende Infektionskrankheit weltweit (1). Im Jahr 2018 bezifferte die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) die Neuerkrankungen auf zehn Mio. Menschen und schätzte, dass ein Viertel der Weltbevölkerung mit dem Erreger *Mycobacterium (M.) tuberculosis* infiziert ist (2, 3). Etwa fünf bis zehn Prozent der Infizierten entwickeln eine aktive Tuberkulose und von diesen erkranken etwa 80 % an einer Lungentuberkulose (4). Extrapulmonale Manifestationen der Tuberkulose betreffen häufig die Lymphknoten, selten die Pleuren, Knochen und Gelenke oder das zentrale Nervensystem. Jedes Organ kann von einer Tuberkulose betroffen sein (5).

Die Tuberkulose beginnt fast immer schleichend und mit unspezifischen Symptomen. Neben Husten mit Auswurf und mäßig erhöhten Körpertemperaturen kommt es erst mit fortschreitender Erkrankung zu Nachtschweiß, ungewolltem Gewichtsverlust und im weiteren Krankheitsverlauf gelegentlich auch zu Hämoptysen. Die körperlichen Veränderungen zusammen mit Abgeschlagenheit, Belastungsdyspnoe und Anämie verliehen der Erkrankung die früher gebräuchliche Bezeichnungen „Weiße Pest“ oder „Schwindsucht“.

Die Tuberkulose ist weltweit vornehmlich eine Erkrankung der armen und sozial schwachen Gesellschaftsmitglieder. Es gibt eine deutliche Korrelation zwischen der Erkrankungshäufigkeit und dem Pro-Kopf-Einkommen (6, 7). Die höchsten Tuberkuloseinzidenzen wurden im Jahr 2017 in Indien (2.740 geschätzte Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr) und China (889 geschätzte Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr) verzeichnet (6), während die Rate in der WHO Region Europa im Mittel bei ca. 30 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr lag (2). In Deutschland betrug die Inzidenz der Tuberkulose 6,7 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr 2018 (8).

1.2 Erreger der Tuberkulose

1.2.1 Familie der Mykobakterien

Zu dem Genus *Mycobacterium* gehören mehr als 190 Subspezies (9). Mykobakterien leben anaerob oder mikroaerophil und bilden keine Sporen. Die Stäbchenbakterien sind dünn, gerade bis wenig geschwungen, $0,2\ \mu\text{m}$ – $0,6\ \mu\text{m}$ breit und $1\ \mu\text{m}$ – $10\ \mu\text{m}$ lang (5).

Mykobakterien, welche die Erkrankung Tuberkulose auslösen können, werden im *M. tuberculosis*-Komplex zusammengefasst. Dazu gehört *M. tuberculosis*, als der weltweit häufigste Erreger, aber auch die Stämme *M. bovis*, der Impfstamm *M. bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG), *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti* und *M. pinnipedii* (5, 10).

Mykobakterien, die nicht zum *M. tuberculosis*-Komplex gehören werden als Nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM) zusammengefasst. Viele dieser NTM können beim Menschen ebenfalls Erkrankungen verursachen, z. B. *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* oder *M. malmoense* (11, 12).

1.2.2 Besonderheiten der Mykobakterien

Der herausragende Unterschied zu den meisten anderen Bakterien ist die wachsähnliche Zellwand der Mykobakterien. Sie enthält einen hohen Anteil an Mykolsäuren und Lipiden (13) und ist verantwortlich für die lipophilen Eigenschaften, die eine wachsähnliche, hydrophobe Barriere bilden. Viele der Unterschiede zu anderen Bakterien können auf die wachsähnliche Zellwand der Mykobakterien zurückgeführt werden. So können die Bakterien unter günstigen Bedingungen wochen- bis monatelang überleben und sind sehr umweltresistent (14). Um die Mykobakterien abzutöten, werden spezielle Desinfektionsmittel benötigt (15, 16).

In die Zellwand können Farbstoffe nur sehr schwer eindringen, so dass zum Sichtbarmachen der Bakterien im Mikroskop Spezialanfärbungen benötigt werden. Der Lübecker Professor Franz Ziehl war 1882 einer der Beschreiber der Ziehl-Neelsen-Färbung (17), bei der mit Hitze der Farbstoff Carbofuchsin in die Zelle eingeschmolzen wird. Nach dieser Behandlung kann auch dreiprozentige Salzsäure die Farbe nicht mehr herauslösen (18). Aufgrund dieses Färbeverhaltens werden Mykobakterien auch als „säurefeste Stäbchen“ bezeichnet.

1.2.3 Wachstumsverhalten der Mykobakterien

Durch die wachsähnliche, hydrophobe Zellwand dringen Nährstoffe ebenfalls schwieriger in die Zelle ein und die Generationszeit ist mit 16 bis 20 Std. (8) sehr lang. Denn im Gegensatz zu den Mykobakterien haben die meisten gewöhnlichen, humanpathogenen Bakterien eine Generationszeit von nur etwa 20 Min. (12), so dass bei ihnen nach einem, spätestens nach zwei Tagen auf der Bakterienkultur sichtbare Kolonien abgelesen werden können. Aufgrund des langsameren Bakterienwachstums der Mykobakterien können dagegen erste sichtbare Tuberkulosekolonien auf Festagar frühestens nach 14 bis 28 Tagen abgelesen werden. Ein negatives Kulturergebnis wird per Definition nach 56 Tagen endgültig sicher festgestellt. Auch im lebenden Organismus führt das langsame Wachstum der Bakterien zu Besonderheiten im Krankheitsverlauf und in der Therapie.

1.2.4 Pathogenese der Tuberkulose

M. tuberculosis wird über erregerhaltige Aerosole übertragen, die von Patienten, die an einer Lungentuberkulose erkrankt sind, durch Husten generiert werden. Die Infektionswahrscheinlichkeit hängt vor allem von der Kontaktdauer und der Menge der aufgenommenen Bakterien, sowie der Virulenz des Erregers und dem Immunstatus des Wirtes ab (19).

Nach Inhalation der Aerosole werden die Mykobakterien, im Rahmen der angeborenen Immunität, unter anderem durch Alveolarmakrophagen (20) und neutrophile Granulozyten phagozytiert (21, 22). Nun werden Bakterien im Idealfall im Phagolysosom des Phagocyten intrazellulär abgetötet, um deren Bestandteile im Rahmen der adaptiven Immunität weiteren Immunzellen präsentieren zu können (23). *M. tuberculosis* besitzt jedoch Abwehrstrategien, um der intrazellulären Abtötung zu entgehen und kann in Alveolarmakrophagen persistieren und sich sogar replizieren (24). Bei immunkompetenten Personen kommt es zu einer Rekrutierung der T-Lymphozyten, die fortan nach Kontakt mit *M. tuberculosis*-spezifischen Antigenen Zytokine, z.B. Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin (IL)-2 und andere Zytokine und Chemokine produzieren können (25). Gelingt eine Abtötung der Bakterien nicht, so kommt es zur Entwicklung einer lokalen oder auch disseminierten Erkrankung. Alternativ können infizierte Alveolarmakrophagen in einem Ringwall aus Lymphozyten, dem sog. Granulom,

abgekapselt werden. Bei der Tuberkulose lösen sich die Zellstrukturen im Inneren des Granuloms in der Regel auf und man spricht von einem „zentral verkäsendem Granulom“. Solche Granulome können über Jahrzehnte persistieren ohne Ausbildung einer Erkrankung. Entwickelt sich durch eine Infektion mit *M. tuberculosis* eine adaptive Immunantwort im Tuberkulin Hauttest (THT) oder in einem IGRA, ohne dass diese Person an Tuberkulose erkrankt, so wird dieser Zustand als latente Infektion mit *M. tuberculosis* (LTBI) bezeichnet. Bei ca. 90 % der immunkompetenten Infizierten bleibt die Infektion auf diese LTBI beschränkt (4). Wird die Integrität der Granulome gestört (z.B. durch eine Therapie mit TNF-Antagonisten oder eine Infektion mit dem humanen Immundefizienzvirus; HIV) können sich die Bakterien im Organismus vermehren und es kann zum Auftreten einer aktiven Tuberkulose kommen. Wenn lebende Mykobakterien, z.B. aus Hohlrumbildungen, Anschluss an das Bronchialsystem erlangen, so können die Bakterien ausgehustet werden. Bakterien in Aerosolen können erneut von Kontaktpersonen inhaliert werden, die daraufhin eine LTBI oder eine aktive Tuberkulose entwickeln können.

1.3 Latente Infektion mit *M. tuberculosis*

Die LTBI kann klinisch mit dem THT oder laborchemisch mit einem interferon-gamma release assay (IGRA) diagnostiziert werden (26). Beim THT wird ein mykobakterielles Kulturfiltrat, das Purified Protein Derivate (PPD), intrakutan injiziert und eine zelluläre allergische Typ IV Reaktion provoziert. Es bildet sich bei einem positivem Ergebnis eine Quaddel, deren pathologische Verhärtung (Induration) nach 48 bis 72 Std. ausgemessen wird (27).

Aufgrund der breiten Antigen-Mischung im PPD kann der Hauttest nicht nur nach einer Infektion mit *M. tuberculosis* (latent oder aktiv), sondern auch nach einer *M. bovis* BCG-Impfung und nach Kontakt zu NTMs positiv werden. Die beiden kommerziellen IGRAs, der QuantiFERON®-TB-Gold Plus enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Quiagen, Hilden, Deutschland) und der TB-SPOT®.TB enzyme-linked immunospot assay (ELISpot, Oxford Immunotec Ltd. Abingdon, Großbritannien), reagieren im Vergleich zum THT spezifisch auf *M. tuberculosis complex* (28).

Klinisch werden IGRAs und der THT verwendet, um das zukünftige Erkrankungsrisiko für eine Tuberkulose bei Personen aus Risikogruppen (z.B. engen Kontaktpersonen, Migranten aus Hochinzidenzländern, Personen vor einer Therapie mit TNF-Antagonisten, HIV-Infizierte) abzuschätzen und somit Personen für eine präventive Antibiotikatherapie zu identifizieren (29). Der negativ prädiktive Wert für die Progression zur aktiven Tuberkulose innerhalb von 2 Jahren beträgt für den ELISpot 97,8 % und für den ELISA 99,8 % (30).

Es werden bei beiden Testverfahren Blutzellen *in vitro* stimuliert. Zur Stimulation werden die beiden *M. tuberculosis*-spezifischen Antigene early secreted antigenic target 6 kDa (ESAT-6) (31), und culture filtrate protein 10 kDa (CFP-10) verwendet (31, 32). Nach 18 Std. Kulturzeit wird die IFN- γ Produktion ausgewertet (33, 34). Im ELISA wird die IFN- γ Konzentration im Kulturüberstand bestimmt. Beim ELISpot wird die Frequenz Antigen-spezifischer IFN- γ produzierender peripherer, mononukleärer Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) *in vitro* nachgewiesen und kann auf die Anzahl an IFN- γ produzierenden Lymphozyten hochgerechnet werden (25). Weder IGRAs noch der THT können zwischen einer aktiven Tuberkuloseerkrankung und einer LTBI unterscheiden (26).

1.4 Impfstoffe

1.4.1 Elimination der Tuberkulose

Im Jahr 2014 hat die WHO eine neue Kampagne zur globalen Tuberkulosekontrolle eingeleitet: die End TB Strategie. Das ambitionierte Ziel ist die langfristige, globale Ausrottung der Krankheit in mehreren Teilschritten. Ab 2020 sind in Fünfjahresschritten detaillierte Ziele definiert worden, so soll bis 2035 die Inzidenz um 90 % und die Mortalität um 95 % gegenüber 2015 gesenkt worden sein (35, 36).

Maßnahmen, um diese „Milestones“ zu erreichen, beziehen sich auf eine verbesserte Therapie, sowie den Infektionsschutz. Voraussetzungen für eine suffiziente Therapie sind eine schnelle Diagnose, insbesondere die Diagnose der Resistenzen des jeweiligen Erregers vor der Therapieeinleitung und eine individuelle, qualitätsgesicherte Therapie über die vollständig empfohlene Therapiedauer (37). Durch die steigende Resistenzlage mit der weltweiten Zunahme multiresistenter Tuberkulosefälle (multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB), bei der die Bakterien mindestens gegen die beiden wichtigen

Erstlinienantibiotika Rifampicin und Isoniazid resistent sind (6), wird das Erreichen dieser Ziele jedoch erschwert (38).

Einen großen Effekt zur Reduktion der Tuberkulosefälle hätte die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes. Nur durch das Verhindern der Erkrankung selbst kann der Erreger *M. tuberculosis* eliminiert und das Ziel der End TB Strategie zu erreicht werden (39-41).

1.4.2 *M. bovis* BCG-Impfung

Albert Calmette und Camille Guérin entwickelten vor etwa 100 Jahren den attenuierten *M. bovis* BCG-Impfstamm, der bis heute der einzige, weltweit klinisch verwendete Impfstoff gegen die Tuberkulose ist (42, 43). Die *M. tuberculosis*-spezifischen sekretorischen Proteine ESAT-6 und CFP-10 werden nicht von dem Impfstamm *M. bovis* BCG gebildet, so dass folglich nach einer *M. bovis* BCG-Impfung in der IGRA-Testung mit ESAT-6 und CFP-10 keine impfinduzierte-Immunreaktion ausgelöst werden kann.

Obwohl *M. bovis* BCG einer der am häufigsten genutzten Impfstoffe ist, sind die Effekte limitiert und die Impfung schützt Erwachsene nicht vor einer Tuberkuloseerkrankung (44, 45). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die *M. bovis* BCG-Impfung bis zu 80 % der Kleinkinder vor einen disseminierten Verlauf der Tuberkulose schützt. Dazu zählen der komplizierte Verlauf einer Miliartuberkulose oder einer tuberkulösen Meningitis, die besonders bei Kleinkindern und Kindern mit einer hohen Mortalität assoziiert sind (46). In Ermangelung einer besseren Alternative wird die *M. bovis* BCG-Impfung in Hochinzidenzländern deswegen immer noch an Neugeborenen durchgeführt (47, 48).

Der *M. bovis* BCG-Impfstamm ist ein Lebendimpfstoff. Nach Applikation entsteht nach einigen Tagen bis Wochen typischerweise eine Hautreaktion (oft mit Ulzeration) (49, 50). Wenn Ulzerationen auftreten, heilen diese in der Regel narbig aus (51, 52).

Die Impfung wird in den ersten Lebenstagen intrakutan appliziert und kann bei immunsupprimierten Personen zu lokalen oder systemischen (BCGitis) Erkrankungen führen (50, 53). Die BCGitis ähnelt einer disseminierten Tuberkulose (54). *M. bovis* BCG kann auch therapeutisch als Teil der Therapie eines Urothelkarzinoms in die Harnblase installiert werden (55) und dabei ebenfalls eine BCGitis auslösen (56).

In vielen Niedriginzidenzländern wird der Impfstoff wegen des limitierten protektiven Effektes und der oben genannten Komplikationen nicht mehr angewendet. So ist die

Impfung mit *M. bovis* BCG in Deutschland seit 1998 von der Ständigen Impfkommission am Robert-Koch-Institut nicht mehr empfohlen (8).

1.4.3 Aktuelle Impfstoffkandidaten

Seit mehreren Jahrzehnten wird an einem verbesserten Impfstoff gegen Tuberkulose geforscht. Aktuell befinden sich 28 Kandidaten in der Vakzine-Pipeline (7). Dazu gehören verschiedene Impfstoff-Klassen, die über unterschiedliche Immunmechanismen wirken (40, 41, 57). Beispiele sind Kandidatenvakzine basierend auf der Immunstimulation mit *M. vaccae*, einem schnellwachsenden NTM (58), der rekombinante BCG-Impfstoff VPM1002 (59) oder das immunogene Mycobacterium tuberculosis Fusionsprotein 72 (M72) mit Adjuvanz System (AS) 01_E (60).

Am weitesten fortgeschritten bezüglich der klinischen Anwendbarkeit sind die Untersuchungen der GlaxoSmithKlines Phase IIb Studie über den Impfstoff M72/AS01_E in Kenia, Südafrika und Zambia. Etwa 1.600 HIV-negative, LTBI-positive Probanden wurden mit dem Impfstoff M72/AS01_E geimpft und die Häufigkeit der Ausbildung einer Tuberkulose erfasst. In der Gruppe mit dem Kandidatenimpfstoff entwickelten 13 Personen eine Tuberkulose im Vergleich zu 26 Personen in Kontrollgruppe. Die Autoren leiteten hieraus einen 50 %igen Impfschutz durch die Impfung gegen die Ausbildung einer aktiven pulmonalen Tuberkulose aus vorbestehender LTBI ab (61, 62).

1.4.4 Surrogat-Markers für den protektiven Effekt

Bislang ist kein weiterer effektiver Impfstoff zur Prävention der Tuberkulose zugelassen worden. Hauptproblem bei der Entwicklung eines effektiven Impfstoffes ist das Fehlen eines Surrogat-Markers, der vorab in der Entwicklungsphase einen Impfschutz vor einer Tuberkuloseinfektion und/oder -erkrankung vorhersagen könnte (63-66).

Als potentieller Marker in der Erforschung wurde die Konversion eines IGRAs nach Impfung in Bezug auf eine beginnende Neuinfektion diskutiert (67). In einer großen Phase IIb-Impfstudie (63) an über 2.600 afrikanischen Kindern wurde der Impfstoffkandidat „modified vaccinia Ankara expressing antigen 85A“ (MVA85A) klinisch getestet. Als mutmaßlicher Surrogat-Marker für die Ausbildung eines Impfschutzes (68, 69) wurde die Induktion MVA85A-spezifischer IFN- γ produzierender T-Lymphozyten im peripheren Blut

untersucht. Zwar zeigte sich in der Impfgruppe die induzierbare Immunantwort mit einem signifikanten Anstieg der MVA85A-spezifischen IFN- γ Produktion im Vergleich zur Placebogruppe, dennoch gab es keinen Unterschied in der Anzahl der neu an Tuberkulose erkrankten Kinder. MVA85A konnte in dieser Studie mit der intradermalen Applikationsform nicht als effektiver Impfstoff überzeugen. Des Weiteren zeigte diese Studie, dass es keine Korrelation zwischen der im IGRA gemessenen Immunantwort und einer Reduktion der Neuinfektionsrate der Tuberkulose gab (66). Es fehlt also der Surrogatemarkers, der einen protektiven Effekt vorhersagen könnte.

1.5 Der MGIA als Infektionsmodell

Der mycobacterial growth inhibition assay (MGIA) ist ein Modell zur Vorhersage eines Impfschutzes gegenüber *M. tuberculosis* (70). Es handelt sich um einen *in vitro* - Infektionsassay, bei dem Zellen mit einem Laborstamm, in diesem Fall *M. tuberculosis* H37Rv, für vier Tage inkubiert werden. Anschließend werden die Zellen lysiert und zusammen mit den Mykobakterien in mikrobiologische Kultursysteme überführt. Hierbei wird die Geschwindigkeit des mykobakteriellen Wachstumverhaltens untersucht.

Im Vergleich zur Antigen-spezifischen Induktion von IFN- γ produzierenden T-Lymphozyten ist dieser Assay möglicherweise besser geeignet, eine Impfstoff-induzierte, schützende Immunität von Zellen gegenüber *M. tuberculosis* anzuzeigen (71-75). So zeigte ein weiterer neuer Impfstoffkandidat H56:CAF01 eine erhöhte Immunkontrolle im MGIA in Mäusen, was einem *in vivo*-Schutz dieser Tieren entsprach (75). Bislang wurde der MGIA in folgenden Zelltypen und Spezies untersucht: in Milzzellen (75-77) und in aus Blutmonozyten weiterdifferenzierten Makrophagen von Mäusen (78), im Vollblut von Rhesusaffen (79), bzw. beim Menschen in Vollblut, in gefrorenen und in frischen PBMC (73, 74, 80, 81) und in Antigen-expandierenden T-Zellen (70). Bisher gibt es keine Anwendung des Assays an humanen Zellen der Lunge, z.B. Zellen einer bronchoalveolären Lavage (BALC).

1.5.1 Kompartiment Lunge

Da die Tuberkulose meistens aerogen erworben wird und es folglich am häufigsten zu einer Erkrankung der Lunge kommt, stellt sich die Frage, ob primär die lokale Immunabwehr der Lunge gegen die Infektion mit *M. tuberculosis* für die Wirkung von Impfstoffkandidaten untersucht werden sollte. Im Gegensatz zur systemischen Immunantwort im peripheren Blut, die mit den PBMC abgebildet wird, besteht im Kompartiment der Lunge eine andere Situation der Immunkontrolle (82, 83). Die bronchoalveoläre Lavage (BAL) kann dabei die Immunsituation des Lungenkompartiments anzeigen. Im Gegensatz zu dem dominierenden Anteil an Lymphozyten in den PBMC besteht die BAL zu nur 3-10 % aus Lymphozyten und zu ca. 90 % aus Alveolarmakrophagen. Diese Alveolarmakrophagen setzen sich aus unterschiedlich differenzierten Subpopulationen zusammen: den luminalen und interstitiellen Makrophagen, die auch einen Teil an Monozyten beinhalten (84-86). Zur Abwehrkontrolle der Lunge gehören neben Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC) noch weitere Faktoren wie das Lungenepithel (87) oder die physiologische Schleimschicht (88).

Um einen möglicherweise besseren Impfschutz über den Infektionsweg der Lunge zu erzielen, wurde die Applikation von Impfstoffen über den inhalativen Weg bereits im Tiermodell erprobt (89). Untersuchungen von Impfstoffkandidaten als Aerosol am Menschen werden zurzeit durchgeführt (90).

Bisher gibt es allerdings keine Studien, welche die Fähigkeit humaner BALC zur Wachstumskontrolle von *M. tuberculosis in vitro* untersuchen und mit der Immunkontrolle von PBMC vergleichen.

2 Forschungsfragen

Für diese Dissertation ergeben sich daher die folgenden Hypothesen:

1. Alveolarmakrophagen sind nach einer Vakzinierung mit *M. bovis* BCG in der Lage das Wachstum von *M. tuberculosis* H37Rv *ex vivo* besser zu kontrollieren als vor Vakzinierung. Dies müsste sich durch eine bessere Wachstumskontrolle von *M. tuberculosis* H37Rv in BALC nach *M. bovis* BCG-Impfung im MGIA zeigen.
2. Der Effekt einer Vakzinierung mit *M. bovis* BCG auf die Fähigkeit der Wachstumskontrolle von *M. tuberculosis* H37Rv unterscheidet sich zwischen Blutmonozyten und Alveolarmakrophagen. Dies würde sich durch eine Verstärkung der Wachstumskontrolle von *M. tuberculosis* H37Rv in PBMC für die systemische Abwehr, beziehungsweise in BALC für die lokale Abwehr im MGIA ausdrücken.
3. Die Induktion Mykobakterien-spezifischer, IFN- γ produzierender T-Lymphozyten im peripheren Blut nach Vakzinierung mit *M. bovis* BCG von gesunden IGRA-naiven Probanden korreliert mit der Fähigkeit von Blutmonozyten nach Vakzinierung das Wachstum von *M. tuberculosis* *in vitro* im MGIA zu kontrollieren. Dies würde sich durch eine verlängerte Kulturzeit im MGIA und gleichzeitiger Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen im ELISpot darstellen.

3 Methoden

3.1 Studiendesign

In der zugrundeliegenden klinischen Studie handelte sich um eine experimentelle, humane Interventionsstudie, deren Konzept an der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel erstellt wurde.

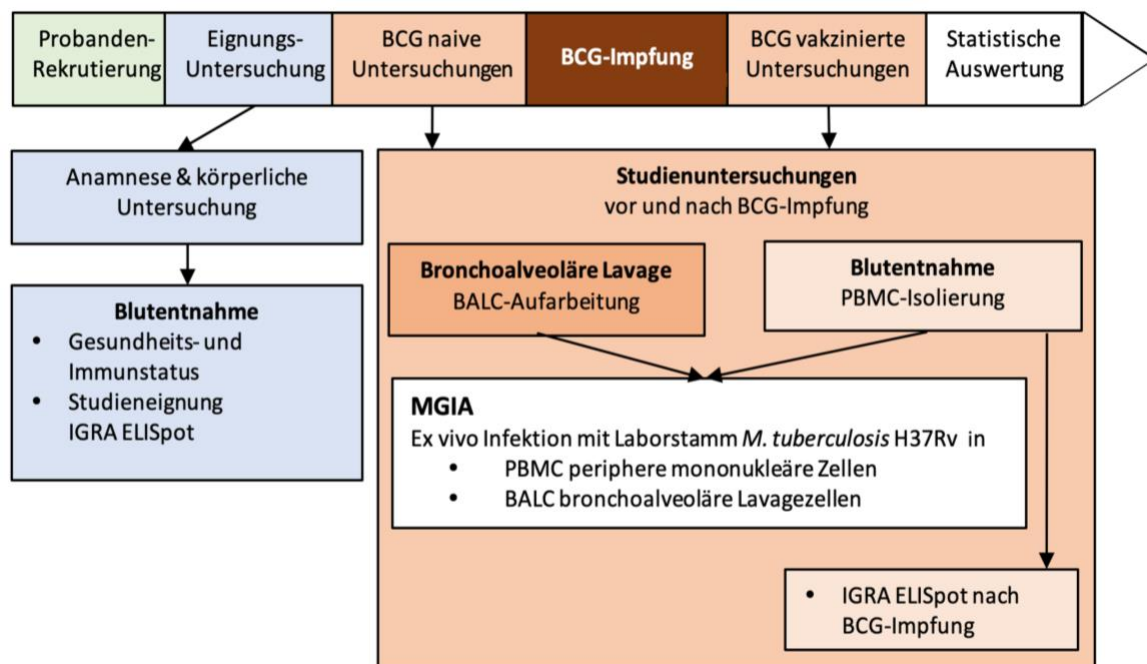


Abbildung 1 – Studiendesign und zeitliche Abfolge der Untersuchungen

Die Reihenfolge der Untersuchungen ist in einem Zeitstrahl grafisch illustriert. Auf die Rekrutierung Freiwilliger folgten die Eignungsuntersuchungen, deren Ergebnisse zum Studieneinschluss oder -ausschluss der Probanden führten. So wurden nur *Mycobacterium* (M.) *bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-naive Probanden eingeschlossen, deren mykobakterielle Immunantwort in den PBMC im interferon-gamma release assay (IGRA) enzyme-linked immunospot assay (ELISpot) negativ war. Zum ersten Studienzeitpunkt wurden die Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC) und die peripheren, mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) der Probanden mit dem Laborstamm *M. tuberculosis* H37Rv infiziert und die Wachstumsgeschwindigkeit im mycobacterial growth inhibition assay (MGIA) untersucht. Der MGIA wurde an PBMC und BALC durchgeführt. Später wurden die Probanden mit dem *M. bovis* BCG-Impfstamm geimpft. Acht bis zehn Wochen nach der Impfung erfolgten die gleichen Untersuchungen im MGIA erneut an den Zellen der nun BCG-geimpften Probanden und eine weitere Testung der Immunantwort im IGRA ELISpot. In der statistischen Auswertung wurden die Daten der Studienuntersuchungen ausgewertet.

3.2 Probandenrekrutierung

Die Studie wurde von der Lübecker Ethikkommission unter dem Aktenzeichen 14-091 am 10. Juni 2014 positiv bewertet (Erklärung der Ethikkommission im Anhang). Die Durchführung der Studie erfolgte nach ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki (2008).

Die Rekrutierung der Teilnehmer erfolgte durch frei zugängliche Aushänge in den Wartezimmern des Medizinischen Versorgungszentrums der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel, sowie durch die Verbreitung von Aufrufen über Emailverteiler, in sozialen Medien und Flugzetteln in der Universität Hamburg, der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und der Universität zu Lübeck.

3.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Es wurden ausschließlich gesunde, immunkompetente Probanden zwischen dem 18. und 65. Lebensjahr in die Studie eingeschlossen. Um die Immunkompetenz festzustellen, wurden die Freiwilligen zu Ihrer Krankengeschichte befragt und im Rahmen einer Blutentnahme verschiedene Parameter bestimmt, die im folgenden Kapitel „3.2.2 Eignungsuntersuchung“ genauer beschrieben sind.

Für das Studiendesign war es notwendig, dass bei den Teilnehmern vorher noch nie Kontakt zu Mykobakterien bestanden hatte. Personen mit früherer *M. bovis* BCG-Impfung oder mit anamnestisch bekannter Tuberkuloseinfektion oder -erkrankung wurden von der Teilnahme ausgeschlossen. In der Blutentnahme zur Eignungsuntersuchung wurden die Freiwilligen auf ihre mykobakterielle Immunantwort im ELISpot getestet, um eine LTBI beziehungsweise den vorherigen Kontakt zu NTM auszuschließen. In die Studie wurden nur Personen ohne Mykobakterien-spezifische Immunantwort im ELISpot eingeschlossen.

3.2.2 Eignungsuntersuchungen

Für die Studie wurden die Tuberkuloseanamnese, die *M. bovis* BCG-Impfanamnese, Geschlecht, Geburtsdatum und Raucherstatus erhoben. Um das Risiko für potentielle Nebenwirkungen durch eine Impfreaktion zu minimieren, wurden folgende Komorbiditäten bei den Probanden ausgeschlossen:

Zum Ausschluss einer Infektionskrankheit wurden, nach einer venösen Blutentnahme, die infektionsserologischen Untersuchungen auf HIV mit HIV 1 und 2 Antigen- und Antikörpernachweis im Mikropartikelenzymimmunoassay, auf Hepatitis B mit Hepatitis B-Surface Antigen im ELISA, Anti-Hepatitis-core Immunglobulin G sowie Immunglobulin M im ELISA und auf Hepatitis C mit Hepatitis C Antikörper im ELISA von der Mikrobiologie in der Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck durchgeführt.

Zum Ausschluss eines variablen Immundefektsyndroms wurden die Immunglobuline mittels Serumeiweißelektrophorese inklusive des Gesamteiweiß untersucht. Weiterhin wurde zum Ausschluss eines akuten Infektes ein Differentialblutbild durchgeführt. Zum Ausschluss einer Gerinnungsstörung wurden die Gerinnungsparameter Thromboplastinzeit nach Quick und die aktivierte partielle Thromboplastinzeit im klinisch-chemischen Labor der Medizinischen Klinik Borstel untersucht. Vor jeder Bronchoskopie wurden das Differentialblutbild und die aktuellen Gerinnungsparameter wiederholt und bei den weiblichen Probanden ein immunchromatografischer 25 mIU/mL Schwangerschaftstests aus Urin durchgeführt.

3.3 Der IGRA ELISpot

PBMC wurden, wie im Kapitel 3.4.2. „Prinzip der PBMC-Isolierung“ beschrieben, vorbereitet.

Stimulation

Die antigenspezifische Stimulation wurde in einer 96 Näpfchen-Mikrotiterplatte durchgeführt, deren Boden mit murinen IFN- γ Antikörpern beschichtet war. 200.000 PBMC wurden in 200 μ L Gesamtvolumen in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Zellkulturlösung mit 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure -Pufferlösung (HEPES) mit 1 % Penicillin-Streptomycin und 5 % fetalem Kälberserum (fetal calf serum;

FCS) bei 37°C in einer 5 % CO₂-Atmosphäre für 18 bis 24 Std. inkubiert. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen unstimuliert kultiviert. Als Positivkontrollen wurde zusätzlich zur Testkitkontrolle Phytohämagglutinin in einem weiteren Mikrotiternäpfchen 10 ng/mL anti-CD3 verwendet. Als *M. tuberculosis*-spezifische stimulierende Antigene wurden ESAT-6 und CFP-10 verwendet, als mykobakterielles Antigen wurde PPD wurde mit 10 µg/mL pro Stimulation eingesetzt. Für ESAT-6 und CFP-10, sowie das Phytohämagglutinin liegen keine Konzentrationsangaben vor, da diese Antigene entsprechend dem Protokoll der Herstellerfirma eingesetzt wurden (33). Hatten die Personen zuvor *in vivo* Kontakt mit dem jeweiligen Antigen, so produzierten die Zellen während der *in vitro* Inkubation IFN-γ, das von den IFN-γ Antikörpern am Wellboden der Mikrotiterplatte gebunden wurde.

Konjugation

Nach mehreren Waschschritten mit Phosphate Buffered Saline Solution (Phosphat gepufferte Lösung; PBS) wurde ein zweiter, muriner, mit alkalischer Phosphatase konjugierter Antikörper hinzugegeben und 60 Min. bei 2-8°C bei Dunkelheit inkubiert. Dieser Antikörper, das sogenannte Konjugat, nutzte zur Bindung ein anderes Epitop des sezernierten IFN-γ, als der Antikörper auf der Mikrotiter-Bodenplatte.

Substratumsatz

Im letzten Arbeitsschritt wurden das chromogene Substrat, die 5-Brom-4-Chlor-3'-Indolyphosphat und Nitro-blau Tetrazolium (BCIP/NBT^{plus})-Lösung hinzugegeben. Das chromogene Substrat wurde während der Inkubation von 10 Min. bei 20°C durch die alkalische Phosphatase des gebundenen Konjugats enzymatisch gespalten bzw. reduziert und bildete ein blauvioletttes Farbprodukt. Die chemische Reaktion des Substrates wurde mit destilliertem Wasser (a. dest.) gestoppt. Nach einer Trocknungszeit von mehr als sechs Std. wurden die entstandenen Punkte (Spots) als spot-forming-cells (SFCs) quantifiziert.

Auswertung

Als positiv wurden Stimulationen mit > 5 spezifischen Spots/ 200.000 Zellen gewertet. Bei mehr als 5 Spots/ 200.000 Zellen in der Negativkontrolle galt die Zellkultur als vorstimuliert. In vorstimulierten Zellkulturen wurde die Antigenstimulation als positiv

gewertet, wenn in der spezifischen Stimulation mindestens doppelt so viele Spots gefunden wurden wie in der Negativkontrolle. Der ELISpot wurde als negativ bewertet, wenn er nicht die Bedingungen für ein positives Ergebnis erfüllte und wenn die Anzahl der SFC in der Positivkontrolle nach der Subtraktion der Spotanzahl in der Negativkontrolle > 20 SFC war.

1. Stimulation

Durch Antigene stimulierte Zellen produzieren in vitro Interferon gamma (IFN- γ), das von gebundenen IFN- γ Antikörpern fixiert wird.

2. Konjugation

Ein zweiter IFN- γ Antikörper bindet ein anderes Epitop des IFN- γ und ist mit alkalischer Phosphatase markiert.

3. Substratumsatz

Durch die alkalische Phosphatase wird ein chromogenes Substrat umgesetzt.

Es wird die IFN- γ einzelner Zellen detektiert und die Spots werden als Spot Forming Units (SFC) ausgezählt.

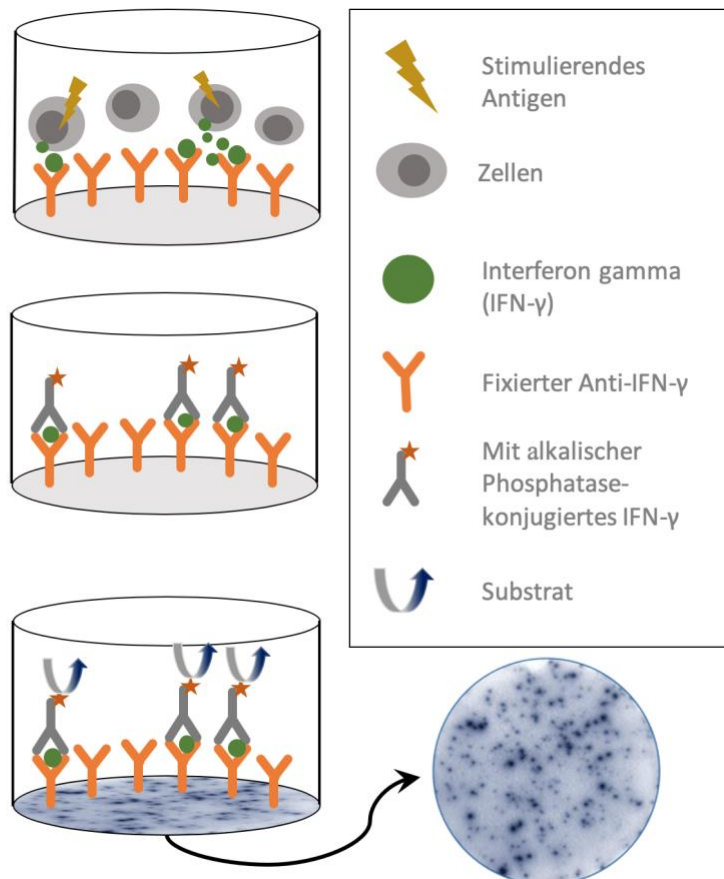


Abbildung 2 – Prinzip des enzyme-linked immunospot assay (ELISpot)

3.4 Zellaufbereitung

3.4.1 Bronchoalveoläre Lavage und BALC-Aufbereitung

Die gesunden und nüchternen Probanden wurden von einer Fachärztin für Pneumologie in der Medizinischen Klinik am Forschungszentrum Borstel nach den Empfehlungen der Leitlinie für Deutschland (91) mit einem flexiblen Bronchoskop untersucht. Nach der Sedierung mit Midazolam und Propofol wurden die Stimmlippen mit 2 %igem Scandicain betäubt und das Bronchoskop unter Sicht in den Mittellappen vorgeschoben. In Wedgeposition auf Segment-/ Subsegmentebene erfolgte die Lavage mit 300 mL steriler, physiologischer Kochsalzlösung, indem jeweils 20 mL Aliquots mit einer Spitze eingespült und anschließend wieder abgesaugt wurden. Das Aspirat, die sogenannte Lavage, wurde vereint und anschließend sofort im Labor verarbeitet, um die Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC) zu isolieren. Dazu wurde die Lavage für 10 Min. bei 1600 Umdrehungen pro Minute; rounds per minute = rpm (578 g) bei 4°C zentrifugiert (Zentrifuge Rotanta 46 RCS, Hettich Benelux B.V., Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 50 mL PBS vereint und gewaschen. Die Zentrifugation wurde wiederholt, der Überstand erneut verworfen, die Zellen in 1 mL PBS resuspendiert und gezählt.

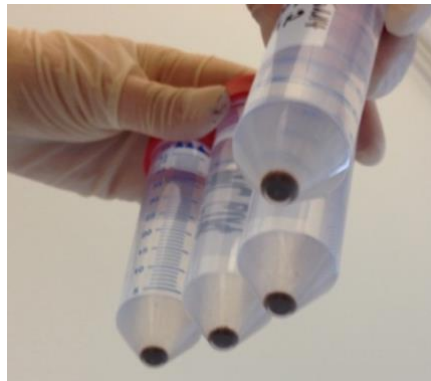


Abbildung 3 – BALC eines Rauchers

Die gut sichtbaren, bräunlichen Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC) eines Zigaretten-konsumierenden Probanden sammeln sich nach der Zentrifugation am Röhrchenboden

3.4.2 Prinzip der PBMC-Isolierung

PBMC wurden aus venös entnommenem Lithiumheparinblut durch eine Dichtezentrifugation (92, 93) isoliert. Das Blut wurde dafür 1:2 mit HANK's Balanced Salt Solution (HBSS) Pufferlösung verdünnt und dann auf dem Zuckerpolymer Bicoll aufgeschichtet. Die mononukleären Monozyten und Lymphozyten bildeten nach der Zentrifugation (Zentrifuge Rotanta 46 RCS, Hettich Benelux B.V., Tuttlingen, Deutschland, 1500 rpm = 465 g 45 Min., bei 22°C ohne Bremse) unter einem Puffer/Plasma-Gemisch einen Interphasenzellring auf dem Bicollmedium. Über diesem Interphasenring sammelten sich die Thrombozyten. Die Erythrozyten und Granulozyten aggregierten und sedimentierten durch die resultierende Dichteerhöhung (94). Nachdem der PBMC-Zellring geerntet wurde, folgten zwei Waschschrte mit PBS-Puffer mit anschließenden Zentrifugationen (2000 rpm = 827 g 15 Min. bei 15°C und 12 Min. bei 1500 rpm = 465 g bei 4°C) zur Entfernung von vereinzelt Thrombozyten und Zelldetritus. Nach der Zellzählung wurden die Zellen in RPMI-Phenolrot aufgenommen.

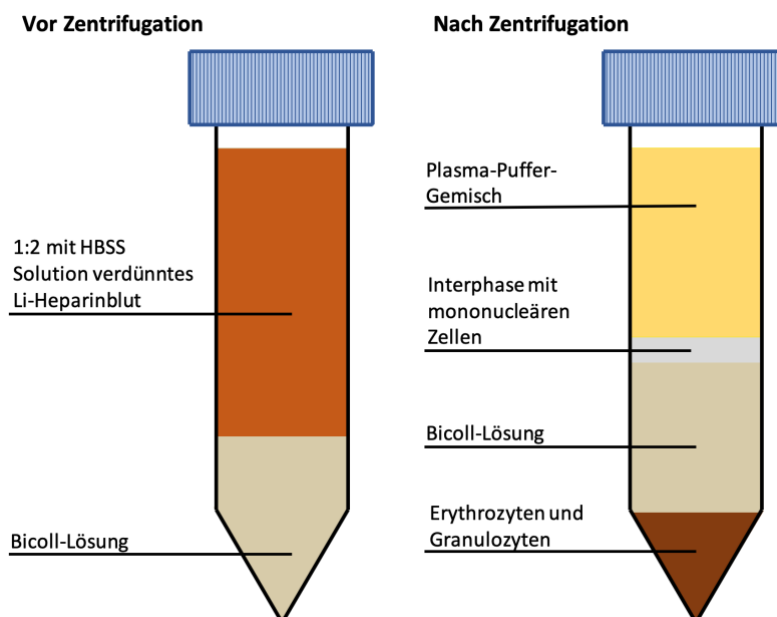


Abbildung 4 – Prinzip der PBMC-Isolierung mittels Dichtezentrifugation

Abgebildet sind Spitzbodenröhrchen vor und nach einer langsamen Zentrifugation bei 465 g von mit HANK's Balanced Salt Solution (HBSS) verdünntem Lithium (Li)-Heparinblut auf Bicoll-Lösung ohne Ausbremsung. Nach der Zentrifugation befand sich ein Interphasenring aus peripheren, mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) auf dem Zuckerpolymer Bicoll, während Erythrozyten und Granulozyten aggregierten und sedimentierten. Der Interphasenring konnte mit Pipetten manuell geerntet werden.

3.4.3 Zellzählung und Differenzierung

Die BALC und PBMC wurden in der Bürker-Türk-Kammer gezählt. Die Zellen wurden in 1 mL Assaymedium (RPMI mit 5 µg/mL Amphotericin B, 100 U/mL Penicillin G und 5 %igem Humanserum) aufgenommen. 25 µL der Zellsuspension wurden mit 225 µL in 1:9-verdünntem Trypanblau in PBS-Puffer versetzt. Das Trypanblau diffundierte durch die Zellwand der nekrotischen Zellen, so dass in dieser Färbung die lebenden Zellen durch das Fehlen einer blauen Färbung erkennbar gemacht wurden (95). Ausschließlich vitale mononukleäre Zellen wurden unmittelbar in Doppelzählung in zwei Großquadraten ausgezählt. Die Rückrechnung für die Zellkonzentration wurde mit folgender Formel durchgeführt:

$$\frac{\text{arithmetisches Mittel der Zellzählungen in 2 Großquadraten}}{1 \text{ mm}^2 \text{ Fläche} * 0,1 \text{ mm Höhe}} * 10 \text{ Verdünnung}$$

Die Zelllösung wurde für eine Differenzierung auf einem Cytospin-Objektträger nach dem Shandon-Cytospin-4® Protokoll (96) aufbereitet. Dazu wurden 5 µL der jeweiligen Zelllösung mit 10 Mio./mL und 100 µL PBS-Puffer pipettiert für 5 Min. bei 750 rpm Umdrehungen und bei 20°C in der Shandon-Cytospin-4® Zentrifuge zentrifugiert.

Die luftgetrockneten Objektträger wurden mit der Haemacolorfärbung nach dem Prinzip der Panoptischen Färbung nach Pappenheim (97) gefärbt und mindestens 1.000 intakte Zellen pro Objektträger mikroskopisch differenziert.

3.4.4 Durchführung der *M. bovis* BCG-Impfung

Die Probanden wurden von einer Fachärztin für Innere Medizin und Pneumologie der Medizinischen Klinik am Forschungszentrum Borstel am nicht-dominanten Oberarm mit 100 µL *M. bovis* BCG Danish 1331 vom Statens Serum Institute (Kopenhagen, Dänemark) intrakutan geimpft.

3.5 Der MGIA

3.5.1 Prinzip des MGIA

Im MGIA wurde eine definierte Konzentration Mykobakterien und eine bekannte Zellzahl der PBMC beziehungsweise BALC in einer Zellkultur gehalten.

Es wurden zwei Inokula ohne Zellen erstellt, die direkt an Tag Null und nach der Inkubation an Tag Vier in die beiden Kultursysteme Flüssigkultur mycobacterial growth indicator tube (MGIT) und Festkultur auf Agarplatten zur Ermittlung der Koloniebildenden Einheiten (colony forming unit; CFU), überführt wurden. Der Infektionsassay selbst wurde mit PBMC und BALC durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde einem solchen Infektionsansatz Vitamin D₃ (1 α , 25 (OH)₂ Cholecalciferol (Vit. D; Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) zugefügt. Für die Variante des Zell-Lyse-Versuches wurden die Zellen vor Beginn der Inkubation mit Ultraschall destruiert.

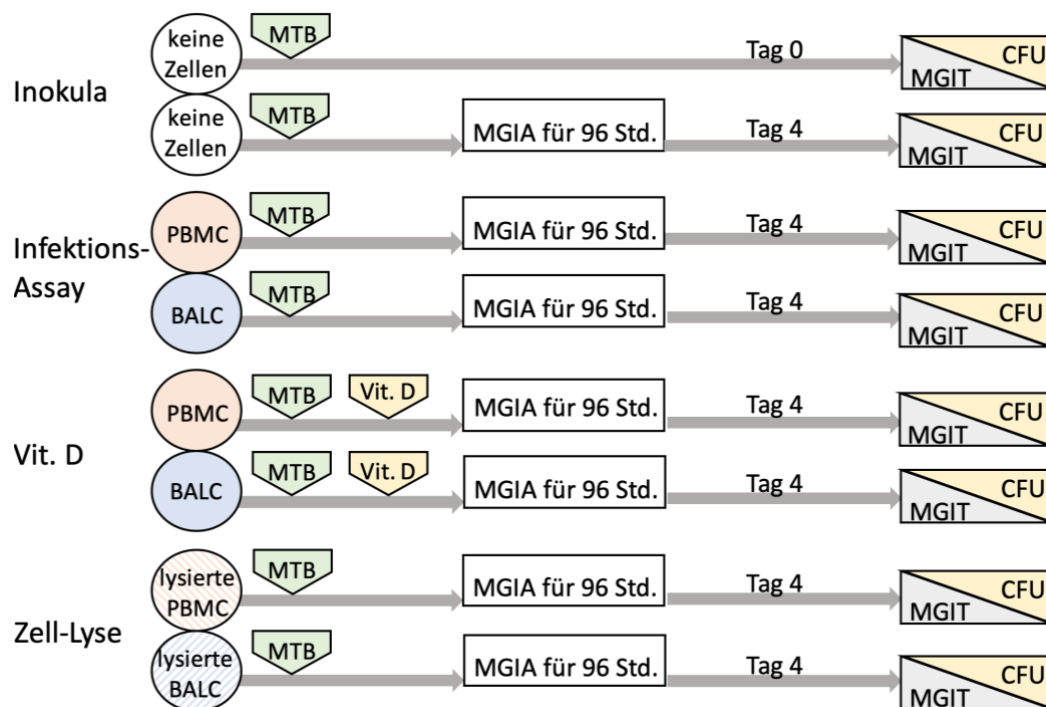


Abbildung 5 – Schema der Assay-Ansätze im MGIA

Im mycobacterial growth inhibition assay (MGIA) wurde in den Inokula *Mycobacterium* (M.) *tuberculosis* (MTB) inkubiert und an Tag Null (T0) und Tag Vier (T4) in mycobacterial growth indicator tubes (MGIT) und auf Agarplatten zur Ermittlung der Koloniebildenden Einheiten (colony forming units; CFU) überführt. Im Infektionsassay wurden periphere, mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) und Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC) eingesetzt. Für den Vitamin D Versuch wurde Vitamin D₃ (1 α , 25 (OH)₂ Cholecalciferol) (Vit. D) hinzugefügt. Im Lyseversuch wurden die vitalen Zellen vor der Inkubation mit Ultraschall lysiert.

Die aufgereinigten Zellen wurden zusammen mit *M. tuberculosis* H37Rv für 96 Std. in der Zellkultur gehalten. Da *M. tuberculosis* sich intrazellulär vermehrt beziehungsweise dort persistiert, mussten Rahmenbedingungen geschaffen werden, die eine optimale Umgebung und Nährstoffgehalt für das Überleben der humanen Zellen bieten und nicht primär für Mykobakterien. Anders als bei Vollblut handelt es sich bei bronchoalveolärer Lavage um ein unsteriles Material und deshalb wurde dem Assay, zur Verhinderung des Wachstums von Pilzen und Bakterien aus der Mundflora, ein Antimykotikum und das Antibiotikum Penicillin G hinzugefügt. Im Gegensatz zu üblichen Zellkulturen wurde auf die Zugabe des gegen *M. tuberculosis* wirksamen Streptomycins verzichtet.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen mit a. dest. und mechanischer Beanspruchung lysiert. Durch die Zugabe von hypotonem Wasser wurden die Zellwände von BALC und PBMC zerstört, während *M. tuberculosis* als säurefestes Stäbchenbakterium mit einem hohen Anteil von Mycolsäuren in der wachsähnlichen Zellwand (98) resistent gegen diesen osmotischen Stress ist. Das Lysat wurde anschließend zur Quantifizierung der Mykobakterien in zwei bakterielle Kultursysteme überführt. Neben der Beimpfung von Middlebrook-H10-Agarplatten zur Bestimmung der CFU wurde das Lysat auch in MGIT überführt, welches eine Basis von flüssigem Middlebrook-H9-Nährmedium enthält.

3.5.2 Herstellung der optimalen Infektionsdosis

In Vorexperimenten wurden speziell für die in der Studie verwendete Charge des Laborstammes *M. tuberculosis* H37Rv Wachstumskurven erstellt. Dabei wurden aus der, mindestens seit zwei Wochen eingefrorenen, Stammlösung 1 mL Aliquots Verdünnungsreihen an unterschiedlichen Tagen erstellt und im MGIT kultiviert (siehe Kapitel 3.5.7. „TTP im MGIT System“). Die Zeit bis zur Kulturpositivität (time to culture positivity; TTP) wurde bestimmt und die Werte (Kapitel 4.2.1 „Ermittlung der optimalen Infektionsdosis“, Tabelle 2) in einer nichtlinearen Regressionsfunktion mit Linearisierung der Exponentialfunktion (Kalibrationskurve Kapitel 4.2.1 „Ermittlung der optimalen Infektionsdosis“, Abbildung 8) dargestellt.

Um einen Unterschied der Wachstumszeit im MGIT sicher anzeigen zu können, wurde nach Rücksprache mit den Erstbeschreiberinnen des Testsystems, Prof. Helen McShane und Dr. Andrea Zelmer (University of Oxford, Großbritannien), eine TTP von 156 Std. im MGIT

angestrebt (76), da die Bakterien sich hier in der exponentiellen Wachstumsphase befanden und deshalb in dieser Zeit eine potentielle Veränderung der maximalen Wirkung am wahrscheinlichsten detektiert werden könnte. Aufgrund dieser Vorversuche wurde eine Infektionsdosis mit einer absoluten Anzahl von 58.000 CFU für die Beimpfung im MGIT ermittelt.

3.5.3 Herstellung des Inokulums

Für jeden Versuchstag wurde die auf 1 mL aliquotierte Bakteriensuspension des *M. tuberculosis* H37Rv aufgetaut und 10 Min. bei 4°C 4000 rpm = 3613 g zentrifugiert (Heraeus Multifuge 15-R Zentrifuge mit Ausschwingrotor TTH400 Nr.75002000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Der Überstand wurde vorsichtig mit einer 1 mL Pipette abgenommen, ohne dabei das Bakterienpellet zu berühren. Anschließend wurde 1 mL Assaymedium (RPMI mit 5 µg/mL Amphotericin B, 100 U/mL Penicillin G und 5 % Humanserum) hinzugefügt und die Bakteriensuspension resuspendiert. Zuerst wurde das Eppendorfröhrchen 1 Min. lang maschinell verwirbelt (Minishaker Vortexer MS2, IKA GmbH und Co. KG, Staufen in Breisgau, Deutschland) und unter Nutzung der Scherkräfte die Suspension danach 10 mal mit einer Kanüle (BD Microlance™3 26 G x 3/8" / ø 0,45 x 10 mm, braun) in einer 1 mL Spritze aufgezogen und unter Druck wieder abgelassen. Danach wurde erneut 1 Min. lang maschinell verwirbelt. Dieses Vorgehen verringerte die Adhäsion der bakteriellen Konglomerate aufgrund des zellwandständigen Glykolipids Trehalose-6,6-Dimykolat (Cord-Faktor) und führte zu einer möglichst homogenen Suspension der Bakterien.

Für jeden Versuchstag wurde eine geometrische, dezimale Verdünnungsreihe der Bakteriensuspension in Assaymedium in der Verdünnung 10^{-1} bis 10^{-4} erstellt. Zusätzlich wurde eine gesonderte Verdünnungen mit *M. tuberculosis* $10^{-2}/5 = 116.000$ CFU/mL für den Assayansatz erstellt, um bei der Arbeitsmenge von 500 µL die zuvor angestrebte Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection; MOI) siehe Kapitel 4.2.1 „Ermittlung der optimalen Infektionsdosis“ zu erreichen.

3.5.4 Assayansatz

Der Assay wurde in einer 24 Näpfchen-Zellkulturplatte (Nunclon™ Delta surface, Apogent, Roskilde, Dänemark) angesetzt. Das ideale Arbeitsvolumen wurde auf 600 µL festgelegt (siehe Kapitel 4.2.1 „Ermittlung der optimalen Infektionsdosis“). Das Assaymedium aus RPMI w/o HEPES, 5 µg/mL Amphotericin B, 100 U/mL Penicillin G und 5 % (0,05 mL/mL) Humanserum wurde jeweils frisch angesetzt, um Kontaminationen vorzubeugen. Im RPMI ist Phenolrot enthalten, das bei einem pH-Wert von 7 rosarot ist. Bei sinkendem pH wird durch einen Farbumschlag nach gelb eine Übersäuerung angezeigt, wie es bei Kontaminationen durch die Stoffwechselprodukte schnell wachsender Bakterien oder Pilze der Fall ist.

In dem Assay wurde die Verdünnungsreihe für Tag Vier mit 500 µL Bakterienverdünnung in den Verdünnungsstufen 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} beziehungsweise 10^{-4} mit 100 µL Assaymedium angesetzt. Die Bakterienverdünnung für den Assayansatz mit $10^{-2}/5$ wurden jeweils in Doppelbestimmung als Zellkultur-Inokulum angesetzt. Jedem Testansatz der Bakterienverdünnung wurden 100 µL der Zellsuspension PMBC bzw. BALC (Stammlösung 10 Mio./mL) hinzugegeben.

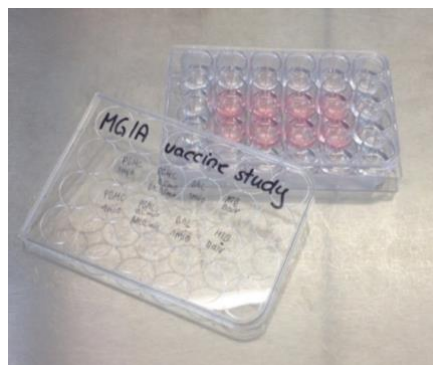


Abbildung 6 - Assay-Ansatz in Zellkulturplatte

Der mycobacterial growth inhibition assay (MGIA) wurde in 24-Näpfchen-Zellkulturplatten durchgeführt

Von der 24 Näpfchen-Zellkulturplatte wurden nur die inneren 8 Wells für den Ansatz genutzt und alle restlichen Näpfchen mit 600 µL sterilem a. dest. befüllt. Der Deckel wurde geschlossen und die Kulturplatte mit einer luftdichten Folie geschützt, um den Verdunstungsverlust möglichst gering und vergleichbar zu halten. Die Platten wurden vier Tage (Mittelwert 96:12 Std., Bereich 91:35 bis 98:00 Std.) bei 37°C, 5 %iger CO₂-

Atmosphäre und in Dunkelheit inkubiert (Hera Cell, Kendro Laboratory Products GmbH, Hamburg, Deutschland) und während dieser Zeit nicht bewegt.

Im Testansatz wurden in Doppelbestimmung je eine Mio. Zellen zu der Bakterienverdünnung für den Assayansatz in Assaymedium hinzugegeben, das bedeutet, dass 500 µL Bakterienverdünnung $10^{-2}/5$ (=116.000 CFU/mL) und 100 µL PBMC bzw. 100 µL BALC (Stammlösung 10 Mio./mL) in Assaymedium enthalten.

3.5.5 Vitamin D Versuch

Für die Vitamin D Positivkontrolle wurden je 500 µL Bakterienverdünnung mit $10^{-2}/5$ (=116.000 CFU/mL) und 100 µL PBMC bzw. 100 µL BALC (Stammlösung mit 10 Mio. Zellen /mL) mit 3 µL Vitamin D3 ($1\alpha, 25$ (OH) $_2$ Cholecalciferol) in einer Endkonzentration von 3 nmol/L inkubiert.

3.5.6 Lyseversuch

Im Ansatz für den Lyseversuch wurden die Zellen mittels Ultraschalles lysiert und das Lysat anstelle der Zellen für den Ansatz verwendet. Die Lyse wurde mit dem Branson Sonifier III W-250 durchgeführt (Nominalfrequenz 20 kHz). Dazu wurden 400 µL aufbereitete Zelllösung 10 Mio./mL in Assaymedium 10 Ultraschallstößen ausgesetzt. Die Temperatur wurde währenddessen kontrolliert und überstieg 42°C nicht. Eine Temperaturerhöhung über 42°C hätte eine Denaturierung der Eiweiße zur Folge gehabt. Danach wurde die Zelllösung mindestens eine Minute auf Eis abgekühlt und diese Ultraschallbehandlung mit anschließender Inkubation auf Eis mindestens drei Mal wiederholt. Nach der Lyse wurden Cytospinpräparate erstellt, wie in Kapitel 3.4.3 „Zellzählung und Differenzierung“ beschrieben. Die Objektträger wurden auf die Anzahl intakter Zellen pro Blickfeld in mindestens zehn Blickfeldern untersucht und mit der Anzahl intakter Zellen pro Blickfeld der unlysierten Zelllösung verglichen. Der Lyseversuch war erfolgreich, wenn > 95 % der Zellen lysiert waren und zugleich Zelldetritus auf dem Objektträger nachweisbar war. Angesetzt wurden 500 µL Bakterienverdünnung $10^{-2}/5$ (=116.000 CFU/mL) mit 100 µL lysierter PBMC bzw. 100 µL lysierter BALC (Stammlösung 10 Mio./mL) in Assaymedium.

3.5.7 Überführung des Ansatzes in Nährmedien

An Tag Vier wurden die Platten ganz leicht schräg gestellt und aus jedem Näpfchen wurden 300 µL Überstand abpipettiert und verworfen. Dann wurden 450 µL steriles a. dest. zugegeben und der Bodensatz resuspendiert, indem die am Boden haftenden Zellen mithilfe der Pipette mechanisch abgeschwemmt wurden. Nach einer Inkubation von 5 Min. bei 20°C wurde das Gesamtvolumen durch auf- und abpipettieren homogen gemischt und dann 60 µL Flüssigkeit für die CFU abgenommen und mit PBS 1/10 bzw. 1/100 verdünnt und auf Middelbrook-7H10-Agarplatten beimpft. Aus allen Näpfchen wurde das gesamte restliche Lysat jeweils quantitativ in ein MGIT Röhrchen überführt.

3.5.8 TTP im MGIT System

In den MGIT Röhrchen befand sich flüssiges 7H9-Middlebrook-Bouillion mit darin gelöstem Sauerstoff unter einer zehnprozentigen CO₂-Atmosphäre.

15 mL Oleic acid Albumin Dextrose Catalase (Ölsäure-Albumin-Dextrose-Katalase-Supplement; OADC) -Medium wurden mit lyophilisiertem PANTA (Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim, Azlocillin) versetzt, diese Nährlösung konnte bei 4°C maximal 3 Tage gelagert werden. 0,8 mL dieses Supplements wurden den MGIT Röhrchen zugegeben und die Röhrchen wurden frühestens nach 20 Min. bei 20°C beimpft, um eine einheitliche Temperatur und Supplementverteilung im Nährmedium sicherzustellen.

Im OADC-Supplement waren Rinderalbumin 50 mg/mL, Dextrose 20 mg/mL, Katalase 30 µg/mL und Ölsäure 600 µg/mL als Nährstoffe enthalten. PANTA (Polymyxin B 400 U/mL, Amphotericin B 40 µg/mL, Nalidixinsäure 160 µg/mL, Trimethoprim 40 µg/mL und Azlocillin 40 µg/mL) wurde als antibiotisch und antimykotisch wirksame Substanzen zugegeben, um Kontaminationen zu vermeiden.

Die MGIT Röhrchen wurden anschließend mit 500 µL Inokulum beimpft. Für die TTP von Tag Null wurden die Verdünnung für den Assayansatz ($10^{-2}/5 = 116.000 \text{ CFU/mL}$), sowie eine höhere (10^{-2}) und eine niedrigere Verdünnungsstufe (10^{-3}) beimpft und im MGIT Gerät inkubiert.

Der von den sich vermehrenden Mykobakterien verursachte Sauerstoffmangel führte zur Fluoreszenz von Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Rutheniumchlorid-Pentahydrat,

das in Silikonkautschuk-Basis am Röhrchenboden fixiert war. Einmal stündlich maß das Gerät vollautomatisch die Fluoreszenz und speicherte den Zeitpunkt, an dem die zuvor definierte Grenze für die Positivität erreicht wurde. Die Ermittlung der Kulturpositivität erfolgte automatisch in einem Gerät des Nationalen Referenzzentrums für Mykobakteriologie, wobei Start- und Endzeit als Messpunkte elektronisch erfasst wurden. Da Verunreinigungen der Flüssigkulturen zu falsch positiven Ergebnissen führen konnten, wurden in Zusammenarbeit mit dem Nationalen Referenzzentrum für Mykobakteriologie, sämtliche positive MGIT Kulturen ausgestrichen und mit der Ziehl-Neelsen-Färbung gefärbt. Nur bei Nachweis säurefester Stäbchen wurde die ermittelte Zeit zur Kulturpositivität für die statistische Auswertung erfasst. Beim Nachweis aller anderen Mikroorganismen, wie z. B. Pilzen oder Hautkeimen mit einer Zeit zur Kulturpositivität von weniger als zwei Tagen, wären die Messergebnisse verworfen worden.

3.5.9 CFU auf Middlebrook-7H10-Agarplatten

Middlebrook-7H10-Agar wurde als zweites Nährmedium zur Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeit mittels CFU ausgewählt, da Mykobakterien auf dem Kulturmedium dort schneller und häufiger wachsen als auf einem Selektivmedium, wie z.B. dem bekannten Löwenstein-Nährmedium (99).

Zur Herstellung der Platten wurde 1,9 g/100 g in Wasser gelöstes Middlebrook-7H10-Agar mit 0,5 % Glycerol auf 125 °C erhitzt und dann langsam abgekühlt. Bei 50-56 °C wurde Rinderserum unter ständigem Rühren hinzugefügt und das Nährmedium zügig ohne Abkühlung verarbeitet. Es wurden 20-25 mL Medium pro Platte luftblasenfrei in quadratische Petrischalen mit Gitternetz pipettiert und abgekühlt, danach bei 37°C für 3 Tage zur Sterilkontrolle bebrütet und anschließend bei 4°C im Dunklen gelagert. Mindestens 3 Verdünnungsstufen wurden zur Ermittlung der CFU von Tag Null auf Middlebrook-7H10-Agar-Platten ausplattiert. Die Verdünnungen für den Assayansatz mit $10^{-2}/5$, 10^{-3} und 10^{-4} inokulierten Mykobakterien waren bei dem verwendeten Laborstamm regulär auszählbar und hatten zwischen 20-200 Kolonien pro Platte. Zur Beimpfung wurden 60 µL der Verdünnung zu 540 µL PBS-Puffer pipettiert. 100 µL dieser PBS-Verdünnung wurden in Doppelbestimmung auf jeweils einer halben Middlebrook-Agar-Platte gleichmäßig mit einer 10 µL-Impföse verteilt. Die Platten wurden zwei Wochen

bebrütet (37°C, 5 % CO₂-Atmosphäre, Function Line Brutschrank, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) und mithilfe einer Vergrößerungsapparatur ausgezählt (Bacterial Colony Counter, Sum Yau Instruments Sdn. Bhd., Ampang Jaya, Malaysia). Die Kolonien wurden nur gezählt, wenn sie das typische mykobakterielle eugone Wachstum aufwiesen und keine Verunreinigung der Platte durch Pilze oder Bakterien vorlag. Die Werte der ausgezählten Kolonien wurden anschließend arithmetisch gemittelt und wie folgt errechnet:

$$\frac{CFU}{mL} = \frac{\text{gezählte Kolonien} * \left(\frac{10mL}{1mL}\right) * \left(\frac{600\mu L \text{ PBS}}{60\mu L \text{ PBS}}\right)}{\text{Verdünnungsfaktor der Verdünnungsreihe}}$$

3.6 Statistik

3.6.1 Fallzahlberechnung

In der vorliegenden Arbeit wurde die gepaarte Wachstumszeit von *M. tuberculosis* H37Rv in BALC und PBMC vor und nach *M. bovis* BCG-Impfung verglichen (zweiseitiger Test). Zur Fallzahlberechnung wurde eine bakterielle Wachstumszeit von 144 Std. in PBMC vor der Impfung und 162 Std. nach der Impfung angenommen (73). Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt und die Teststärke (Power) auf 0,8, um 10 Wochen nach *M. bovis* BCG-Impfung eine gemittelte Verlängerung der *M. tuberculosis* -Wachstumszeit um 12,5 % in den Alveolarmakrophagen detektieren zu können, war eine Stichprobengröße von 16 Probanden notwendig. Unter der Berücksichtigung einer möglichen Ausfallrate von 10 % wurde als Zielwert eine Probandenanzahl von 18 Teilnehmerin für den Studieneinschluss ermittelt.

3.6.2 Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden allgemeine lineare „mixed-effects“ Modelle verwendet, um die geschätzten festen Effekte (Schätzer; β) für alle Prädiktoren zu beschreiben und grafisch darzustellen (mit Ausnahme der später beschriebenen Eosinophilen und PPD-Ausreißer). Außerdem wurden so die p-Werte für Unterschiede zwischen den zu analysierenden Gruppen ermittelt, während die möglichen Störeffekte der anderen Prädiktoren angepasst wurden. Da mehrere Messdaten für jedes Individuum in der Studie vorhanden waren, wurden die Modelle für die Korrelation zwischen

Beobachtungen an derselben Person korrigiert, indem die individuellen Identitäten in dem Modell als zufällige Effekte einbezogen wurden. Die Prädiktoren waren unterschiedliche Gruppierungen (wie *M. bovis* BCG-Impfung: nach / vor und Vitamin D: nein / ja) und der numerische Prädiktor die Verdünnung des Ergebnisses. Die CFU-Zählungen und die TTP aus den Fluoreszenzdaten wurden logarithmisch transformiert, um für alle Analysen eine annähernde Normalität zu erreichen. Da jedes Ergebnis nur einmal modelliert wurde, sind alle Schätzungen einschließlich der p-Werte für ein bestimmtes Ergebnis aufeinander abgestimmt worden.

Es wurden McNemar-Tests verwendet, um die p-Werte für Unterschiede in den Eosinophilen (Tabelle 15 – Effekt der Impfung auf Gesamtzellzahl und Zelldifferenzierung der BALC) zu schätzen. Der exakte Fisher-Test zum Vergleich zweier Raten wurde für die Schätzung der PPD-Ausreißer (Tabelle 16 – Effekt der Impfung auf die Immunantwort im IGRA ELISpot) verwendet.

Zur grafischen Darstellung wurden gekerbte Boxplots (notched boxplots) genutzt, um die Verteilung der Ergebnisse in Gruppen zu veranschaulichen. Die Kerben repräsentieren die 95 % Konfidenzintervalle für die Mediane. Wenn sich die Kerben nicht überlappen, unterscheiden sich die Mediane der Gruppen signifikant und umgekehrt (100). Alle Statistiken wurden in der Basis R durchgeführt: Einer Sprache und Umgebung für statistisches Rechnen und R-Paketen lmer und lmerTest (101).

4 Ergebnisse

4.1 Beschreibung der Probandenpopulation

19 Personen zwischen 19 bis 56 Jahren wurden als geeignete Probanden eingestuft und zunächst wurden neun Männer und neun Frauen für die erste Untersuchung bronchoskopiert. Eine Probandin wurde danach von der Studie ausgeschlossen, weil sie nach der Untersuchung eine vollständig reversible arterielle Hypotonie am ehesten durch einen untypischen prolongierten Effekt der Narkotika entwickelte. Eine weitere Probandin zog ihre Einwilligung für die zweite Bronchoskopie zurück. Eine zunächst nicht untersuchte Freiwillige mit unauffälligen Ergebnissen in der Eignungsuntersuchung wurde nun in die Studie aufgenommen und bronchoskopiert. Alle 17 verbleibenden Probanden erhielten die *M. bovis* BCG-Impfung und wurden acht bis zehn Wochen nach der Impfung ein zweites Mal bronchoskopiert. In Abbildung 7 ist das Flussdiagramm der Probandenrekrutierung dargestellt.

Das mediane Alter der 19 Studienteilnehmer betrug 25 Jahre, 53 % (10/19) der Teilnehmer waren weiblich und alle Probanden waren europäischer Ethnie. 21 % (4/19) Probanden betrieben während der Studie täglichen Nikotinkonsum durch Inhalation von Zigarettenrauch und jeder Teilnehmer hatte negative Ergebnisse in der HIV-, Hepatitis B- und Hepatitis C-Serologie.

Tabelle 1 – Beschreibung der Probandenpopulation

Angaben sind n (Anzahl) der Probanden und % (Prozentzahl). Mit Nikotinkonsumenten sind Probanden gemeint, die während der Studie täglichen, inhalativen Zigarettenkonsum fortgesetzt haben. Des Weiteren wurde die Zeit zwischen der *Mycobacterium* (M.) *bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) -Impfung und der zweiten Bronchoskopie in Tagen erfasst.

	Gesamt (n=19)	Männlich (n=9)	Weiblich (n=10)
Alter in Jahren, Median (Bereich)	25 (19-56)	23 (19-45)	28 (21-56)
Nikotinkonsumenten, n (%)	4 (21,1)	2 (22,2)	2 (20,0)
Zeit zwischen BCG-Impfung und der 2. Bronchoskopie in Tagen, Median (Bereich)	56 (54-70)	56 (54-70)	56 (55-70)

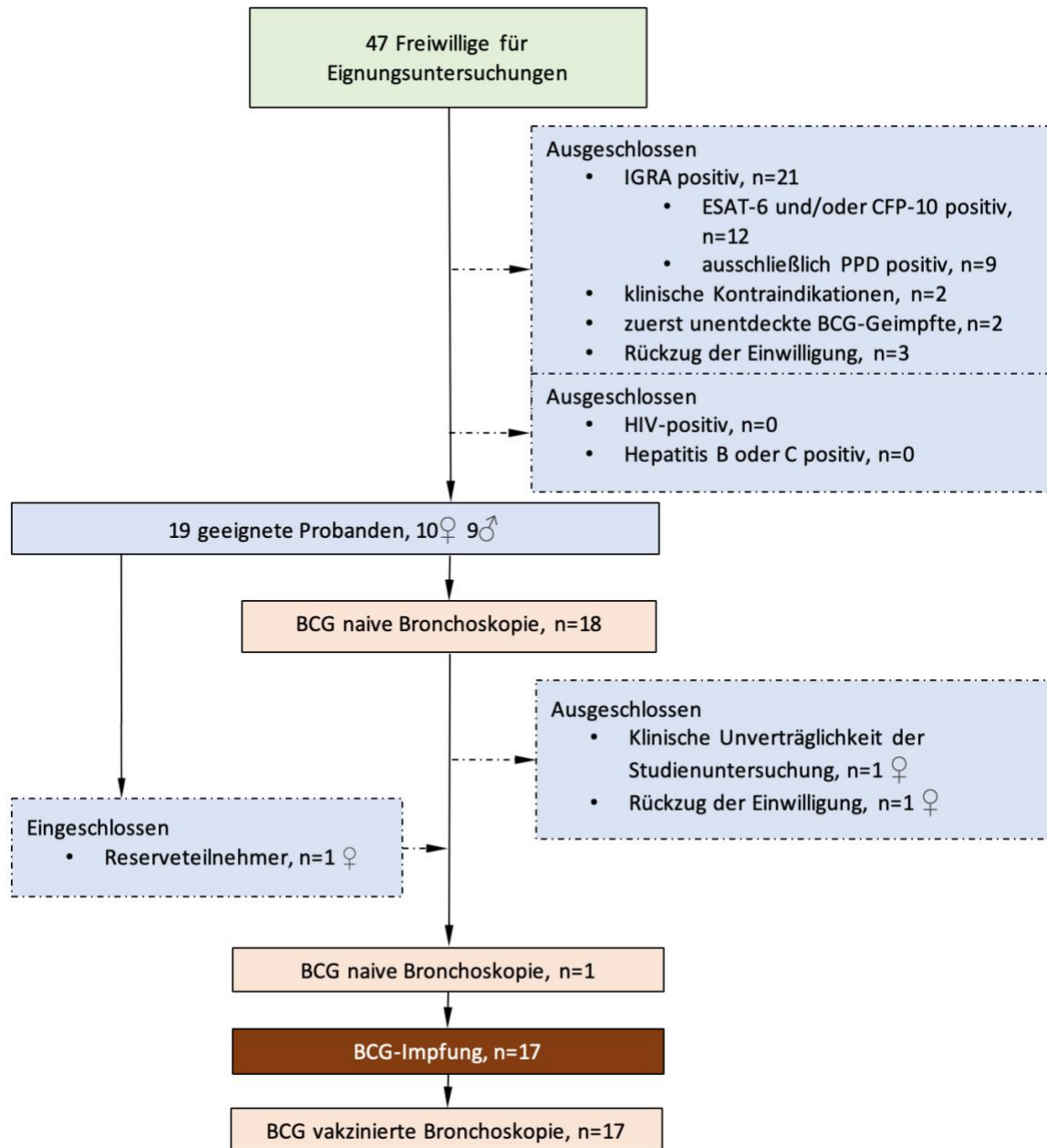


Abbildung 7 – Flussdiagramm der Probandenrekrutierungen und der Untersuchungen

47 Freiwillige wurden in der Eignungsuntersuchung überprüft, davon wurden 28 als ungeeignet eingestuft: 21 Personen hatten eine positive Antwort im interferon-gamma release assay (IGRA). Davon waren 12 Immunantworten positiv auf Stimulation mit early secreted antigenic target 6kDa (ESAT-6) und/ oder culture filtrate protein 10kDa (CFP-10) und neun auf Stimulation mit Purified Protein Derivate (PPD) positiv. Zwei Freiwillige hatten klinische Kontraindikationen gegen die Impfung bzw. die Bronchoskopie. Bei zwei Personen fanden sich während der körperlichen Untersuchung typische *Mycobacterium (M.) bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-Impfnarben und drei weitere zogen die Einwilligung zurück. Bei keinem Probanden wurde das humane Immundefizienz Virus (HIV), Hepatitis B oder Hepatitis C nachgewiesen. 18 Probanden durchliefen die erste Bronchoskopie, eine Probandin zog die Einwilligung zurück. Eine weitere Probandin hatte klinische Unverträglichkeiten entwickelt und wurde von der weiteren Teilnahme ausgeschlossen. Eine zuvor nicht eingeschlossene Probandin wurde nun in die Studie aufgenommen, so dass 17 Probanden die Impfung und die zweite Bronchoskopie erhielten.

4.1.1 *M. bovis* BCG-Impfung

Durch die Impfung entstand bei den Probanden eine intradermale Quaddel, die nach wenigen Minuten vom Körper resorbiert wurde. Nach drei bis sechs Wochen bildeten sich bei 15 der 17 (88 %) Probanden eine Ulzeration von maximal 10 mm Durchmesser aus. Zwei Probanden konnten bei sich keine Hautreaktion feststellen und keiner der Probanden beobachtete unerwartete Arzneimittelreaktionen durch die Impfung oder Impfkomplicationen. Im Anhang ist der zeitliche Verlauf einer BCG-Impfulzeration exemplarisch dargestellt (Kapitel 9.1 „BCG-Impfulzeration im zeitlichen Verlauf“).

4.2 Test Qualität

4.2.1 Ermittlung der optimalen Infektionsdosis

In Vorexperimenten wurde (wie im Kapitel 3.5.2. „Herstellung der optimalen Infektionsdosis“ beschrieben) die optimale Infektionsdosis ermittelt. Die TTP wurde bei unterschiedlichen Konzentrationen der Infektionsdosis des H37Rv (gemessen als CFU/mL) bestimmt (Tabelle 2). Die Werte sind in einer nichtlinearen Regressionsfunktion mit Linearisierung der Exponentialfunktion (Kalibrationskurve) in Abbildung 8 dargestellt.

Tabelle 2 – Messwerte der Kalibrationskurve des Wachstums von *M. tuberculosis* in TTP

Die Messwerte zur Erstellung der Kalibrationskurve des Wachstumverhaltens von *Mycobacterium* (*M.*) *tuberculosis* H37Rv in Zeit bis zur Kulturpositivität (time to culture positivity; TTP) sind in Std. dargestellt. In der ersten Spalte stehen die errechnete Bakterienanzahl des Inokulums angegeben als Koloniebildende Einheit pro Milliliter (colony forming unit; CFU/mL). In sechs Messreihen wurden die TTP in Std. jeweils in Duplikaten in fünf verschiedenen Konzentrationen der Verdünnung pro Messreihe ermittelt.

	Zeit bis zur Kulturpositivität im MGIT (TTP in Std.)					
CFU/mL	Messreihe 1	Messreihe 2	Messreihe 3	Messreihe 4	Messreihe 5	Messreihe 6
5.800.000	60	66	65	65	64	77
	60	66	66	65	65	77
580.000	96	101	101	115	99	99
	97	101	101	114	99	99
290.000	113	117	120	126	114	111
	111	118	121	125	115	112
58.000	163	161	171	154	150	151
	160	159	175	154	149	152
5.800	211	212	219	195	194	201
	207	213	215	196	198	206

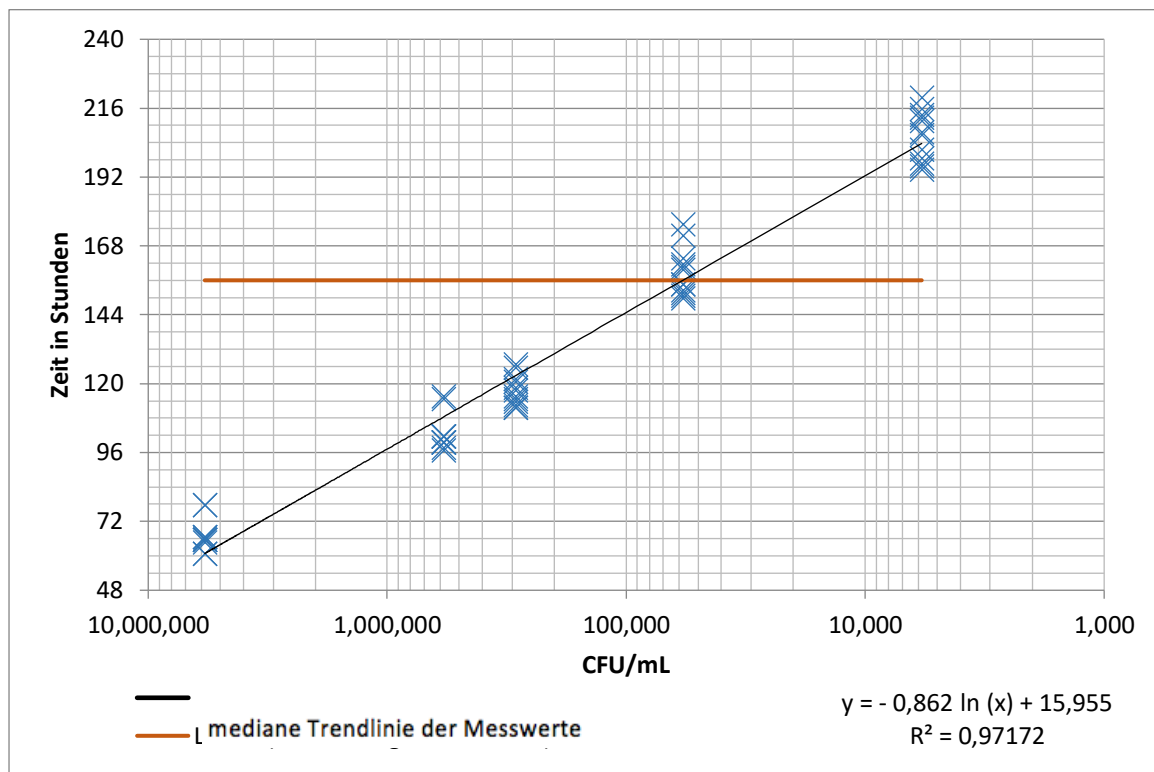


Abbildung 8 – Kalibrationskurve der Wachstumsdauer von *M. tuberculosis* in TTP zu CFU

Abgebildet ist das Wachstum von *Mycobacterium* (*M.*) *tuberculosis* H37Rv in einer Kalibrationskurve zur Bestimmung der Multiplizität der Infektionsdosis (multiplicity of infection; MOI) von *M. tuberculosis* H37Rv auf Festagar in errechneten $\log_{10}$ der Koloniebildenden Einheiten (Colony forming units; CFU) und in der Flüssigkultur mycobacterium growth indicator tube (MGIT) als Zeit bis zur Kulturpositivität (time to culture positivity; TTP) in Std.. Die orange Linie markiert den Linear bei 156 Std. und die schwarze Linie stellt die mediane Trendlinie der Messwerte dar. Das Bestimmtheitsmaß R^2 beträgt 0,97 bzw. 97,17 % und hat damit eine sehr hohe Anpassungsgüte.

Der grafisch abgeleitete Wert für $y = 156$ Std. betrug 58.229 CFU/mL.

$$y = -0,826 \ln(x) + 15,955$$

$$y = 15,955 - 0,862 \log(x)$$

$$[x = e^{15955/862 - 500y/431}]$$

$$[x = e^{-140045/862}]$$

$$[x = e^{\frac{15955}{862} - \frac{500y}{431}}]$$

Aufgrund dieser Vorversuche wurde eine Infektionsdosis mit einer absoluten Anzahl von absoluten 58.000 CFU für die Beimpfung im MGIT angestrebt. Die MOI entspricht der

Anzahl der Bakterien pro Zellen und ergab somit für die verwendete Charge des *M. tuberculosis* H37Rv 58.000 CFU (absolut) auf eine Mio. Zellen (PBMC oder BALC). Die MOI betrug in den Experimenten folglich 0,058 Bakterien / Zelle.

Der Assay wurde in einer 24 Näpfchen-Zellkulturplatte angesetzt. Die ideale Arbeitsmenge in einer Zellkulturplatte betrug 0,2 - 0,5 mL/cm² um eine gute Belüftung von Zellen und Bakterien zu gewährleisten (102). Bei einer optimalen Arbeitsmenge von 0,38 - 0,95 mL/Näpfchen wurde in diesem Assay ein gezieltes Endvolumen von 600 µL verwendet.

In den Verdünnungskurven an Tag Null und Tag Vier, die mit dem Inokulum ohne Zellen erstellt wurden, korrelierte die TTP signifikant mit der Verdünnung. Jede Verdünnungsstufe resultierte in einer Steigerung der TTP um 43,5 Std. (95 % KI: 40,7 bis 46,2; $p < 0,0001$). In Abbildung 9 ist das 95 % Konfidenzintervall als blauer Bereich um die schwarze Medianlinie dargestellt und verdeutlicht die Präzision der Verdünnungen.

4.2.2 Zeiteffekt

Die Mykobakterien wurden vier Tage in einer Zellkultur gehalten. Um die Vermehrung der Mykobakterien ohne Zellen zu quantifizieren, wurden die Inokula von Tag Null und Tag Vier verglichen: Im Median verringerte sich die Zeit zur Kulturpositivität von Tag Null auf Tag Vier um 17,1 Std. (95 % KI: 15,0 bis 19,2, $p < 0,0001$; siehe hierzu Abbildung 9).

In Tabelle 3 sind die Kenndaten der Steigungen in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit von *M. tuberculosis* zusammengefasst. Die Steigungen der Wachstumskurven unterschieden sich an Tag Null und an Tag Vier signifikant. An Tag Vier war die Wachstumsgeschwindigkeit im Median um 17,1 Std. (95 % KI: - 19,1 Std. bis - 15,0 Std. $p < 0,0001$) reduziert. Die Steilheit der Korrelation war gleichbleibend (Abbildung 9).

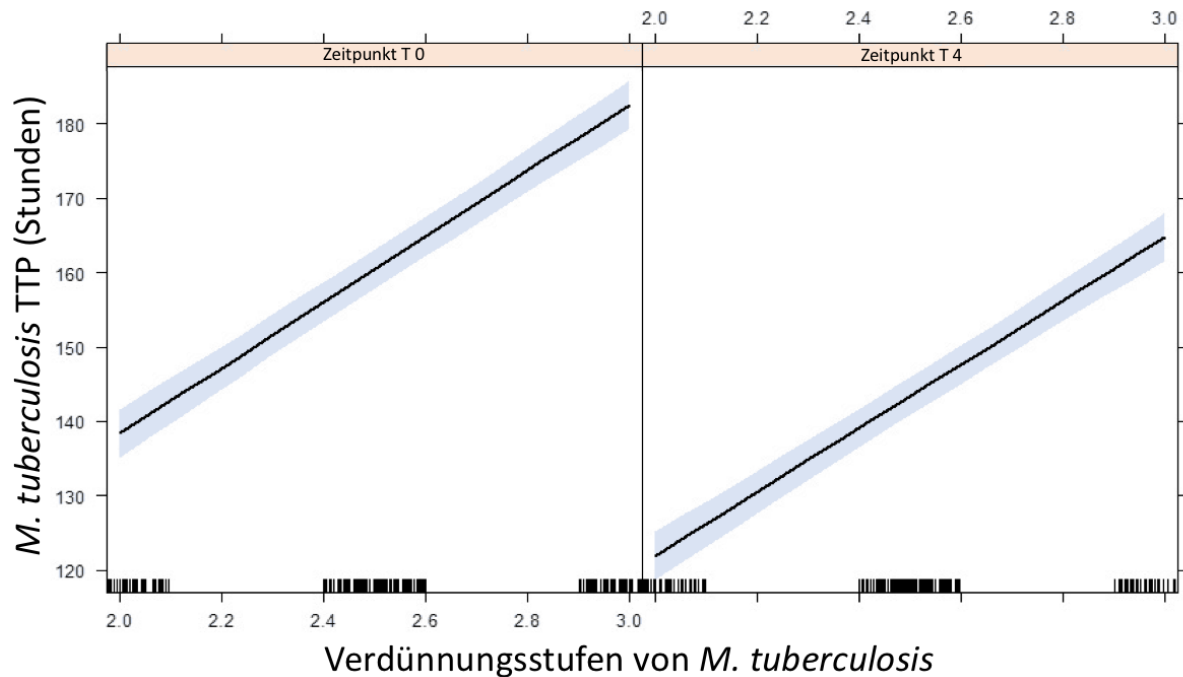


Abbildung 9 – Korrelation von Wachstumsdauer zu Konzentration von *M. tuberculosis* im MGIT

Im mycobacterium growth indicator tube (MGIT) wurde die Zeit bis zur Kulturpositivität (engl.: time to culture positivity; TTP) von *Mycobacterium* (*M.*) *tuberculosis* H37Rv in Std. gemessen. Die Abhängigkeit der Wachstumsdauer von *M. tuberculosis* ist abhängig von der Verdünnungsstufe und wird mit einer schwarzen, medianen Trendlinie dargestellt. Die Zeit bis zur TTP ist gegen die einzelnen Verdünnungsstufen der Inokula aufgetragen. Das in blau dargestellte 95 % Konfidenzintervall zeigt die Präzision der ermittelten Inokula an Tag Null (T0) und Tag Vier (T4)

Tabelle 3 – Die Abhängigkeit der Wachstumsdauer von *M. tuberculosis* in TTP

Die Abhängigkeit der Wachstumsdauer von *Mycobacterium* (*M.*) *tuberculosis* H37Rv nach Verdünnung im mycobacterium growth indicator tube (MGIT) wurde als Zeit bis zur Kulturpositivität (time to culture positivity; TTP) in Std. ermittelt. Verglichen wurden Zeitpunkt Tag Null (T0) zu Zeitpunkt Tag Vier (T4) und Verdünnungsstufe (V) 2 zu V3. Angegeben wurden Median, Konfidenzintervall (KI) und der Signifikanzwert (probability; p)

Analysierte Gruppe	Vergleich	Median	95 % KI		p-Wert
Zeitpunkt - Konstante	T0 zu T4	-17,1	-19,1	-15,0	< 0,0001
Verdünnung - Steigung	V2 zu V3	43,5	40,7	46,2	< 0,0001

Der MGIA in MGIT ist eine Neuerung in der Bestimmung der Wachstumsrate und -geschwindigkeit. Diese Ergebnisse des MGIA in MGIT wurden mit dem klassischen Standard, der CFU-Bestimmung, verglichen.

Die Ergebnisse der CFU zeigten an Tag Null und Tag Vier keine Unterschiede, so dass in diesem Fall für die Darstellung der Präzision nur eine Grafik erstellt wurde. Es fand sich eine breite Streuung der ausgezählten Kolonien um den Mittelwert.

In Abbildung 10 ist die Korrelation zwischen der TTP und den CFU grafisch dargestellt.

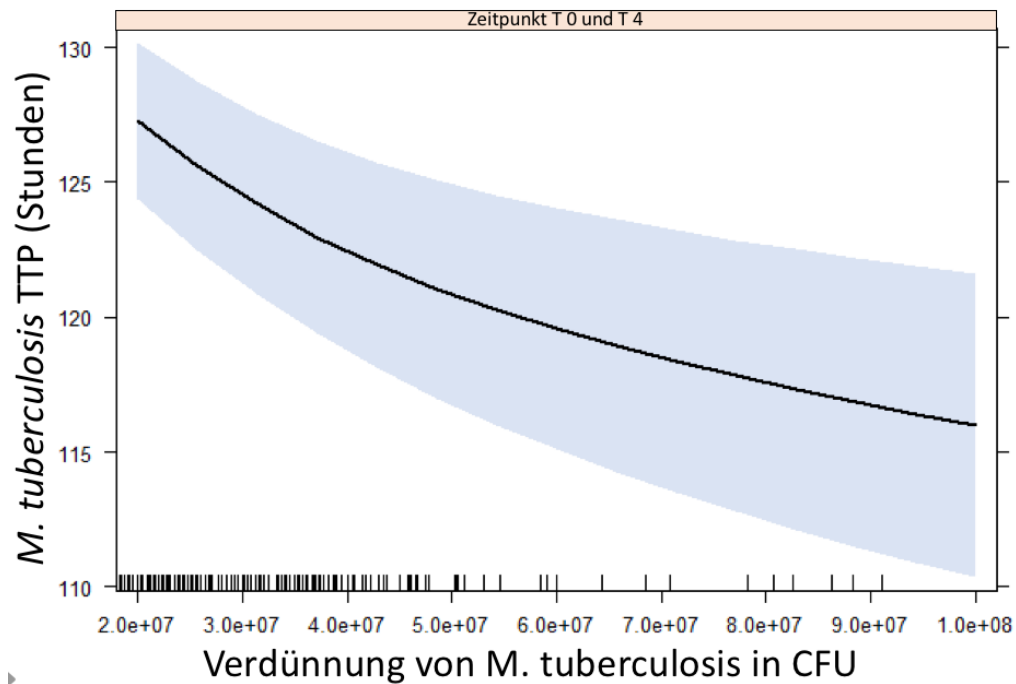


Abbildung 10 – Korrelation der Wachstumsdauer von *M. tuberculosis* in CFU zu TTP

Die Wachstumskorrelation von *Mycobacterium* (*M.*) *tuberculosis* H37Rv wurde in der Zeit bis zur Kulturpositivität (time to culture positivity; TTP) in Std. in mycobaterium growth indicator tubes (MGIT) und auf Festagar in Log₁₀ Koloniebildende Einheiten (Colony forming units; CFU) gemessen. Die Korrelation des Wachstums von *M. tuberculosis* H37Rv in TTP in Std. gegen die Menge der CFU auf Festagar ist, unter Zuhilfenahme der Eulerschen Zahl (*e*), halblogarithmisch dargestellt. Es wurden sämtliche Werte von Zeitpunkt Tag Null (T0) und Zeitpunkt Tag Vier (T4) in die Grafik aufgenommen. Der blaue Bereich illustriert das 95 % Konfidenzintervall um die schwarze Medianlinie.

Je höher die Wachstumsrate der Mykobakterien im Inokulum war, desto höher war auch die Wachstumsrate in den Zellkulturen $\Delta +0,79$ Std. (95 % KI: 0,44 bis 1,14; $p < 0,0001$). Es gab keine signifikanten Unterschiede vor und nach der Impfung (PBMC $p = 0,2435$; BALC $p = 0,2596$). Deswegen gibt es pro Bild nur eine Steigung. Die Impfung hatte auch keinen Effekt auf die Steigung (PBMC $p = 0,0800$; BALC $p = 0,4818$). Die Steilheit der Korrelation war als vor und nach der Impfung gleichbleibend, siehe Abbildung 11.

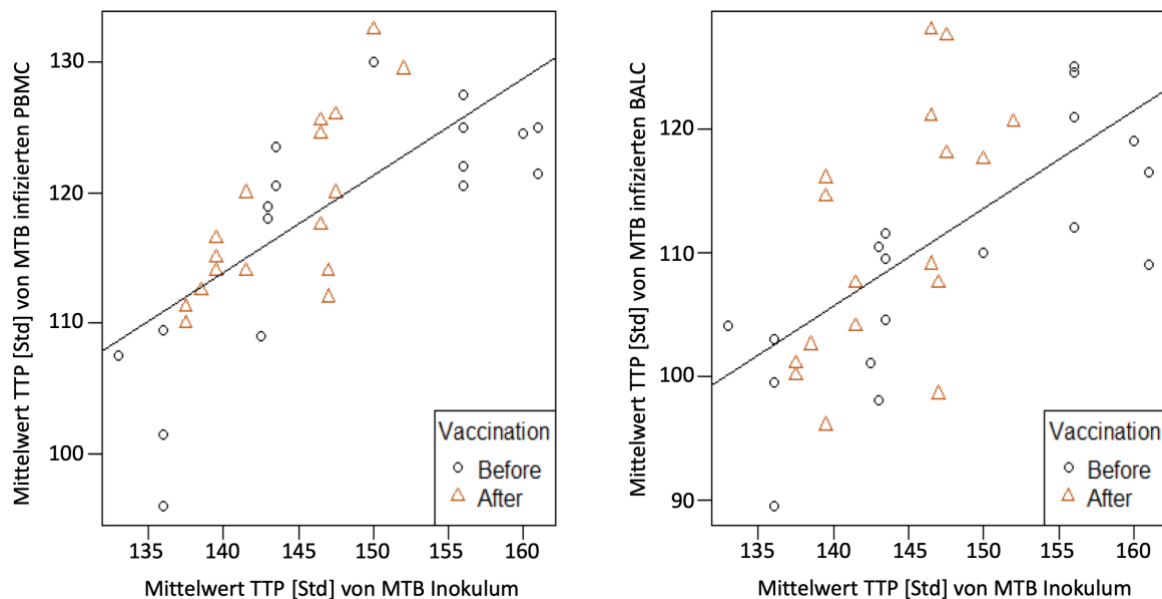


Abbildung 11 – Effekt des Inokulum auf die Messwerte in TTP

Dargestellt ist die Korrelation des Wachstums von *Mycobacterium* (*M.*) *tuberculosis* (MTB) H37Rv im mycobacterium growth indicator tube (MGIT) in Zeit bis zur Kulturpositivität (time to culture positivity; TTP) in Std. bei Kultivierung mit peripheren, mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) bzw. Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC) gegen die Kultivierung als MTB Inokulum. Der Mittelwert der TTP wurde aus den MGIT-Duplikaten gebildet. Die Steilheit der Korrelation ist grafisch unter Zuhilfenahme der schwarzen Trendlinie für sämtliche Messwerte dargestellt. Die Messwerte sind in Bezug auf den Zeitpunkt der Impfung mit schwarzen Kreisen vor der *M. bovis* BCG-Impfung und orangenen Dreiecken nach *M. bovis* BCG-Impfung zu unterscheiden.

Für die CFU zeigen die Daten eine breitere Streuung. Es gab keine Korrelation zwischen den gezählten Kolonien der Mykobakterien im Inokulum und den ausgezählten Kolonien der Zellkulturen. Die CFU zeigen eine diffuse Streuung. Aufgrund dieser Unpräzision in den CFU-Ergebnissen ließ sich in Abbildung 12 grafisch keine Trendlinie erstellen.

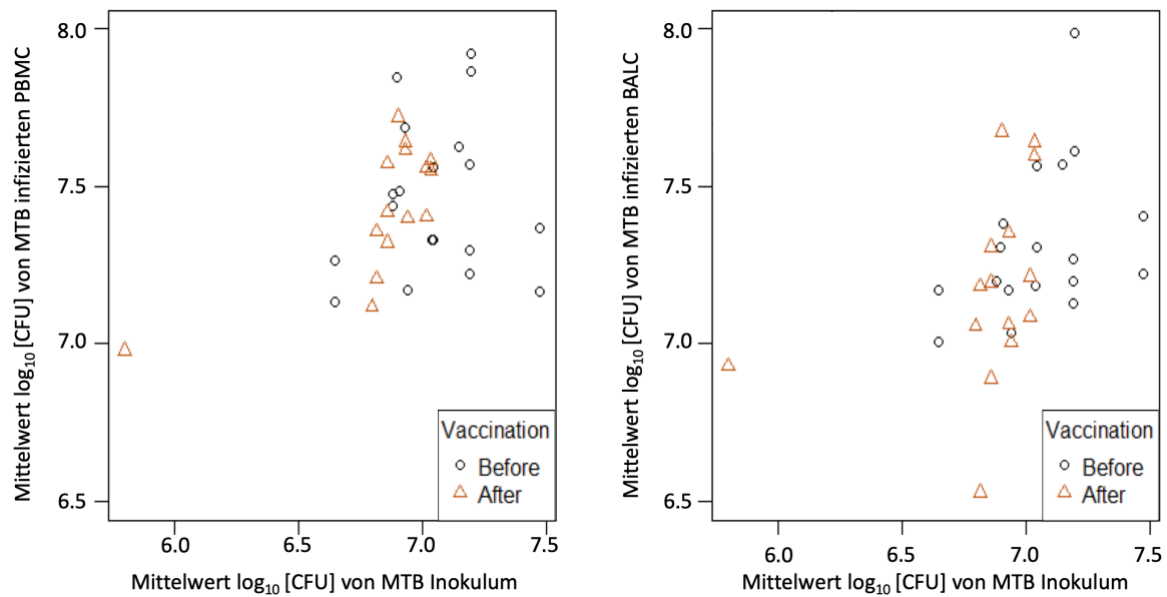


Abbildung 12 – Effekt des Inokulum auf die Messwerte in Log₁₀ CFU

Dargestellt ist das Wachstum von *Mycobacterium* (M.) *tuberculosis* (MTB) H37Rv in Log₁₀ Koloniebildende Einheiten (colony forming units; CFU) auf Festagar bei Kultivierung mit peripheren, mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) bzw. Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC) gegen die Kultivierung des MTB Inokulum. Der CFU-Mittelwert wurde aus sechs der jeweils drei auszählbaren Verdünnungsstufen gebildet. Aufgrund der Streuung der Messwerte ist die Darstellung einer Korrelation bei der weiten Streuung der Messwerte im Vergleich zu Abbildung 11 nicht sinnvoll. Die Messwerte sind in Bezug auf den Zeitpunkt der Impfung mit schwarzen Kreisen vor der *M. bovis* BCG-Impfung und orangenen Dreiecken nach *M. bovis* BCG-Impfung zu unterscheiden.

4.3 TTP-Ergebnisse des MGIA

Die Zeit, die das bekannte Inokulum mit *M. tuberculosis* bis zur Kulturpositivität benötigte, wurde gemessen und nach untersuchten Gruppen verglichen. Eine längere TTP entsprach einem langsameren Wachstum von *M. tuberculosis* in der Kultur.

4.3.1 Effekt der Zellen in TTP

Da *M. tuberculosis* ein intrazellulär wachsender Erreger ist, war die Wachstumsrate entsprechend schneller in Zellkulturen verglichen zum Inokulum, in dem *M. tuberculosis* ohne Zellen mit RPMI kultiviert wurde. In den Versuchen (vor und nach der Impfung) wuchsen die Mykobakterien im Medium ohne Zellen im Median in 146,0 Std., während die in der PBMC-Kultur nur 120,0 Std. (Inokulum zu PBMC Δ Median + 26 Std.) und in der BALC-Kultur nur 110,0 Std. benötigten (Inokulum zu BALC Δ Median + 36 Std., siehe Tabelle 4

und Abbildung 13). Der Δ Median gab dabei nur den deskriptiven Unterschied in dieser kleinen Studienpopulation an.

Um einen Rückschluss auf die Grundgesamtheit zu ermöglichen, wurde der Schätzer β für die einzelnen Parameter in allgemeinen linearen „mixed-effects“ Modellen errechnet. So betrug der Schätzer für die Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit zwischen Inokulum zu PBMC $\beta + 25,5$ Std. (95 % KI: 28,5 bis 22,5; $p < 0,0001$) und zwischen Inokulum und BALC-Kultur $\beta + 33,2$ Std., (95 % KI: 36,2 bis 30,2; $p < 0,0001$, siehe Tabelle 4).

Tabelle 4 – Effekt der Zellgruppen vor und nach *M. bovis* BCG-Impfung in TTP

Der Effekt der *Mycobacterium (M.) bovis Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-Impfung wurde nach Zellgruppen im mycobacterial growth indicator tube (MGIT) in Zeit bis zur Kulturpositivität (time to culture positivity; TTP) in Std. verglichen. Es wurden Inokulum, periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) und Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells: BALC) verglichen. Angegeben wurden die Differenz der Mediane (Δ), der Schätzer (β) mit Konfidenzintervall (KI) und der Signifikanzwert (probability; p).

Analysierte Gruppe	Vergleich	Δ	β	95 % KI		p-Wert
vor Impfung & nach Impfung	Inokulum / PBMC	26	25,5	28,5 -	22,5	< 0,0001
vor Impfung & nach Impfung	Inokulum / BALC	36	33,2	36,2 -	30,2	< 0,0001
vor Impfung & nach Impfung	PBMC / BALC	10	17,7	23,6 -	11,8	< 0,0001

4.3.2 Effekt zwischen PBMC und BALC in TTP

Der Vergleich zwischen PBMC und BALC zeigte eine höhere Wachstumskontrolle in PBMC als in BALC (Median PBMC 120 Std. zu BALC 110 Std., respektive). Der geschätzte Unterschied der Wachstumsgeschwindigkeit in PBMC und BALC betrug $\beta + 17,7$ Std. (95 % KI: 23,6 bis 11,8; $p < 0,0001$, siehe Tabelle 4).

In der weitergehenden Analyse zeigte sich dabei kein Unterschied durch die Zellgruppen PBMC und BALC (analysierte Gruppe vor Impfung $\beta + 8,993$ Std; 95 % KI: 5,640 bis 12,350; $p < 0,0001$; analysierte Gruppe nach Impfung $\beta + 7,635$ Std., 95 % KI: 4,338 bis 10,937; $p < 0,0001$, siehe Tabelle 5 und Abbildung 13).

Tabelle 5 – Effekt der *M. bovis* BCG-Impfung verglichen nach Zellgruppen in TTP

Der Effekt der *Mycobacterium* (M.) *bovis* *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-Impfung wurde im mycobacterial growth indicator tube (MGIT) in time to culture positivity (TTP) in Std. nach Zellgruppen verglichen. Es wurden periphere, mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) mit Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC) verglichen. Angegeben wurden Schätzer (β), Konfidenzintervall (KI) und der Signifikanzwert (probability; p).

Analysierte Gruppe	Vergleich	β	95 % KI		p-Wert
vor Impfung	PBMC / BALC	8,99	5,640 -	12,350	< 0,0001
nach Impfung	PBMC / BALC	7,635	4,338 -	10,937	< 0,0001

4.3.3 Effekt der *M. bovis* BCG-Impfung in TTP

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei dem Vergleich der Fähigkeit der Zellen, vor und nach der Impfung die Wachstumsrate von *M. tuberculosis* H37Rv zu beeinflussen: Vor der Impfung im Vergleich zu nach der Impfung stieg die TTP für PBMC um $\beta + 2,244$ Std. (95 % KI: - 1,174 bis 5,623, p = 0,1990). In den BALC stieg die TTP um $\beta + 0,886$ Std. im Vergleich vor der Impfung und nach der Impfung (95 % KI: - 2,467 bis 4,202; p = 0,6040, siehe Tabelle 6 und Abbildung 13).

Tabelle 6 – Effekt der *M. bovis* BCG-Impfung auf PBMC und BALC in TTP

Dargestellt ist der Effekt der *Mycobacterium* (M.) *bovis* *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-Impfung auf periphere, mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) und Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC). Ermittelt wurde die Wachstumsrate der Mykobakterien in mycobacterial growth indicator tube (MGIT) in time to culture positivity (TTP) in Std.. Angegeben wurden Schätzer (β), Konfidenzintervall (KI) und Signifikanzwert (probability; p).

Analysierte Gruppe	Vergleich	β	95 % KI		p-Wert
PBMC	vor Impfung / nach Impfung	2,244	-1,174	- 5,623	0,1990
BALC	vor Impfung / nach Impfung	0,886	-2,467	- 4,202	0,6040

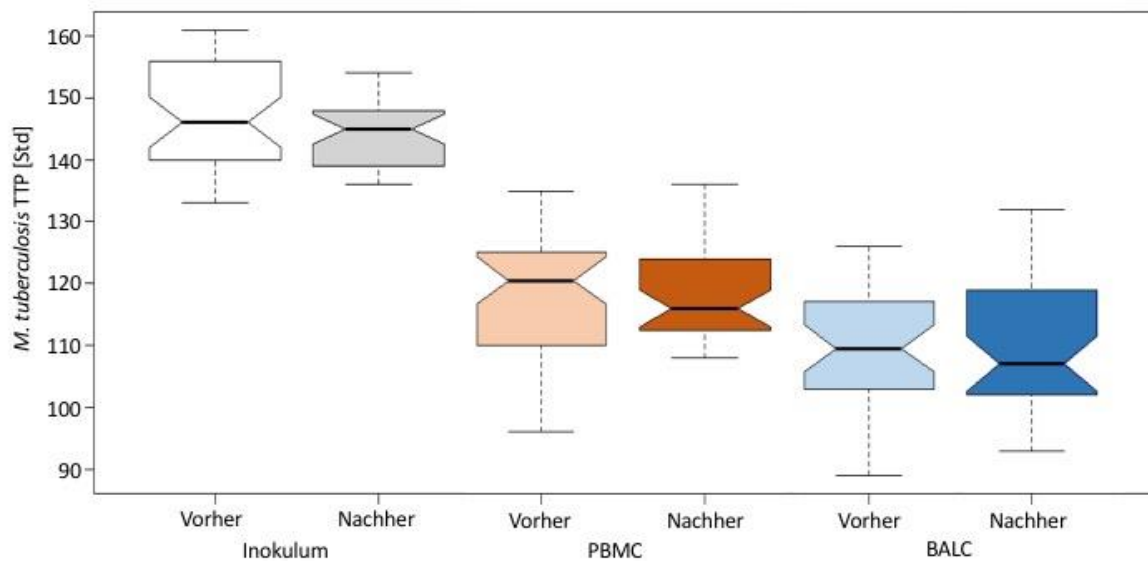


Abbildung 13 – Effekt der *M. bovis* BCG-Impfung in TTP

Dargestellt sind gekerbte Boxplots in Bezug auf den Zeitpunkt der *Mycobacterium* (*M.*) *bovis* *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-Impfung. Ermittelt wurde die Wachstumsrate von *M. tuberculosis* H37Rv in der Flüssigkultur mycobacterial growth indicator tube (MGIT) gemessen als Zeit bis zur Kulturpositivität (time to culture positivity; TTP) in Std. und stratifiziert nach zellfreiem Inokulum, bzw. nach infizierten Zellgruppen:

- weiß/grau: Das Inokulum wurde ohne Zellen angesetzt.
- orange/rot: periphere, mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC)
- hellblau/dunkelblau: Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC)
- : Die schwarze Linie zeigt den Median.
- Notch: Die Kerbungen (Notches) zeigen das 95 % Konfidenzintervall des Median.
- Boxplot: Die Figur oberhalb und unterhalb des Median (Boxplot) ist durch die 75. bzw. 25. Perzentile des Interquartilsabstand (interquartile range; IQR) definiert.
- Barchart: Die gestrichelten Balken (Barchart) zeigen den Gesamtbereich der Messdaten.

4.4 CFU-Ergebnisse des MGIA

Kohärente Ergebnisse konnten in der Anzahl der CFU auf Agarplatten gefunden werden. Auf den Platten zeigte sich ein langsames Wachstum der Mykobakterien in einer geringeren Zahl auszählbarer Kolonien, dargestellt in Log_{10} CFU.

Die grafische Darstellung von Abbildung 13 und Abbildung 14 verhalten sich reziprok, weil eine höhere Bakterienanzahl in CFU mit einer kürzeren Wachstumszeit in TTP korreliert.

4.4.1 Effekt der Zellen in CFU

M. tuberculosis wuchs in höherer Anzahl der CFU in Anwesenheit von Zellen verglichen zum Inokulum, in dem *M. tuberculosis* ohne Zellen mit RPMI kultiviert wurde (PBMC zu Inokulum $\beta + 0,579 \text{ Log}_{10}$ CFU; 95 % KI: 0,470 bis 0,689; $p < 0,0001$; BALC zu Inokulum $\beta + 0,359 \text{ Log}_{10}$ CFU; 95 % KI: 0,250 bis 0,206; $p < 0,0001$, siehe Tabelle 7 und Abbildung 14).

Tabelle 7 – Effekt der *M. bovis* BCG-Impfung verglichen nach PBMC und BALC in Log_{10} CFU

Dargestellt ist der Effekt der *Mycobacterium* (*M.*) *bovis* *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-Impfung verglichen nach Zellgruppen in Log_{10} Koloniebildende Einheit (colony forming units; CFU). Verglichen wurden periphere, mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) zu Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC) und das Inokulum ohne Zellen. Angegeben wurden Schätzer (β), Konfidenzintervall (KI) und der Signifikanzwert (probability; p).

Analysierte Gruppe	Vergleich	β	95 % KI		p-Wert
vor Impfung & nach Impfung	PBMC / Inokulum	0,579	0,470 -	0,689	< 0,0001
vor Impfung & nach Impfung	BALC / Inokulum	0,359	0,250 -	0,468	< 0,0001
vor Impfung & nach Impfung	BALC / PBMC	0,126	0,046 -	0,206	0,0023

4.4.2 Effekt zwischen PBMC und BALC in CFU

Der Vergleich zwischen dem Wachstumsverhalten von *M. tuberculosis* in BALC und PBMC zeigte einen signifikanten Unterschied. Im Gegensatz zu den Ergebnissen in TTP war die Wachstumskontrolle der CFU-Ergebnisse vor und nach der Impfung allerdings in den BALC besser ausgeprägt als in den PBMC (vor der Impfung $\beta + 0,1 \text{ Log}_{10}$ CFU; 95 % KI: 0,1 bis 0,0;

$p = 0,0034$; nach der Impfung $\beta + 0,2 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$, 95 % KI: 0,3 bis 0,1; $p < 0,0001$, siehe Tabelle 8 und Abbildung 14).

Tabelle 8 – Effekt der *M. bovis* BCG-Impfung verglichen nach PBMC und BALC in $\text{Log}_{10} \text{ CFU}$

Aufgetragen ist der Effekt der *Mycobacterium (M.) bovis* *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-Impfung verglichen nach Zellgruppen in Log_{10} Koloniebildende Einheiten (colony forming units; CFU). Verglichen wurden periphere, mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) zu Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC). Angegeben wurden Schätzer (β), Konfidenzintervall (KI) und der Signifikanzwert (probability; p).

Analysierte Gruppe	Vergleich	β	95 % KI		p-Wert
vor Impfung	PBMC / BALC	0,1	0,2	0,0	0,0034
nach Impfung	PBMC / BALC	0,2	0,3	0,1	< 0,0001

4.4.3 Effekt der *M. bovis* BCG-Impfung in CFU

Nach der Impfung fand sich in den PBMC im Vergleich zu den Ergebnissen vor der Impfung, ebenso wie bei den TTP Ergebnissen, kein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten (PBMC $\beta \pm 0,0 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$; 95 % KI: - 0,1 bis 0,1; $p = 0,7512$). Bei den BALC zeigte sich im Vergleich zwischen vor und nach der Impfung jedoch eine Reduktion der ausgezählten Kolonien nach der Impfung ($\beta - 0,1 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$; 95 % KI: 0,0 bis 0,2; $p = 0,0231$, siehe Tabelle 9 und Abbildung 14).

Tabelle 9 – Effekt der PBMC und BALC verglichen nach Impfstatus in $\text{Log}_{10} \text{ CFU}$

Effekt der Zellgruppen in Log_{10} Koloniebildende Einheiten (colony forming unit; CFU) Effekt der *Mycobacterium (M.) bovis* *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-Impfung auf periphere, mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) und Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC). Angegeben wurden Schätzer (β), Konfidenzintervall (KI) und der Signifikanzwert (probability; p).

Analysierte Gruppe	Vergleich	β	95 % KI		p-Wert
PBMC	vor Impfung / nach Impfung	0,0	-0,1	0,1	0,7512
BALC	vor Impfung / nach Impfung	-0,1	-0,2	0,0	0,0231

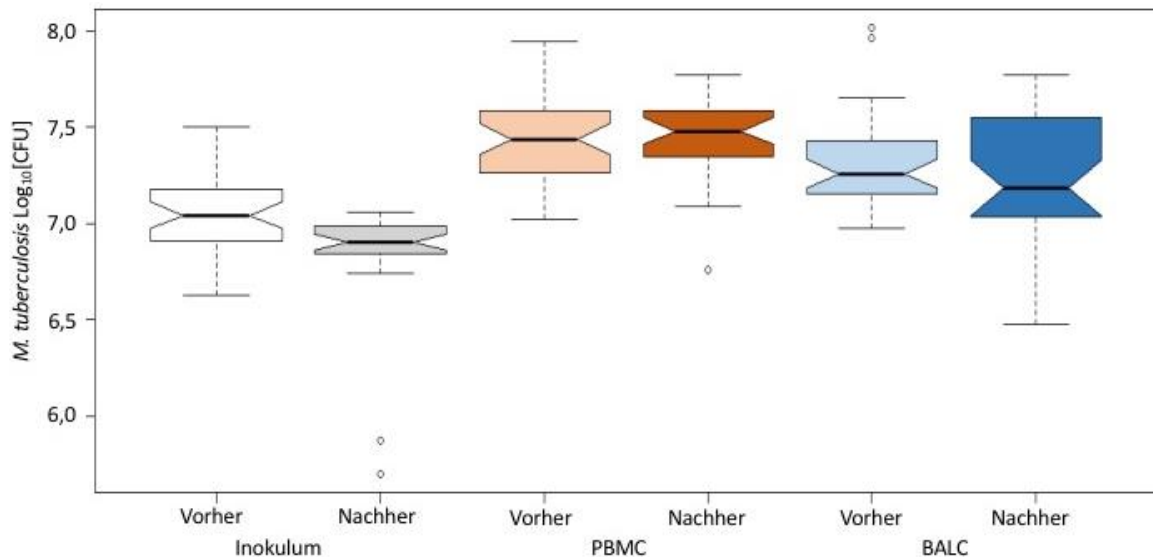


Abbildung 14 – Effekt der *M. bovis* BCG-Impfung in Log₁₀ CFU

Dargestellt sind gekerbte Boxplots in Bezug auf den Zeitpunkt der *Mycobacterium* (*M.*) *bovis* *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-Impfung. Ermittelt wurde die Wachstumsrate von *Mycobacterium* (*M.*) *tuberculosis* H37Rv auf Festagar gemessen als Menge der Koloniebildenden Einheiten (colony forming units; CFU) und stratifiziert nach zellfreiem Inokulum, bzw. nach infizierten Zellgruppen:

- weiß/grau: Das Inokulum wurde ohne Zellen angesetzt.
- orange/rot: periphere, mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC)
- hellblau/dunkelblau: Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC)
- : Die schwarze Linie zeigt den Median.
- Notch: Die Kerbungen (Notches) zeigen das 95 % Konfidenzintervall des Median.
- Boxplot: Die Figur oberhalb und unterhalb des Median (Boxplot) ist durch die 75. bzw. 25. Perzentile des Interquartilsabstand (interquartile range; IQR) definiert.
- Barchart: Die gestrichelten Balken (Barchart) zeigen den Gesamtbereich der Messdaten.

4.5 Vitamin D als Positivkontrolle

Durch die Substitution von Vitamin D wurde das mykobakterielle Wachstums gehemmt. In PBMC erhöhte sich die ursprüngliche TTP unter Einfluss von Vitamin D von Median 116 Std. auf 139 Std. (Δ Median 23 Std., β + 20,6 Std.; 95 % KI: 16,8 bis 24,3; $p < 0,0001$) und in BALC von Median 109 Std. auf 130 Std. (Δ Median 21 Std., β + 17,2 Std.; 95 % KI: 13,4 bis 21,0; $p < 0,0001$, siehe Tabelle 10 und Abbildung 15).

Tabelle 10 – Effekt von Vitamin D in PBMC und BALC in TTP

Dargestellt ist der Effekt von Vitamin D₃ 1 α , 25 (OH)₂ Cholecalciferol (Vit. D)-Effekt in peripheren, mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) und Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC). Die Zeit bis zu Kulturpositivität (TTP) wurde in Std. gemessen. Angegeben wurden die Differenz der Mediane (Δ), Schätzer (β), Konfidenzintervall (KI) und der Signifikanzwert (probability; p).

Analysierte Gruppe	Vergleich	Δ	β	95 % KI		p-Wert
PBMC	ohne Vit. D / mit Vit. D	23	20,6	16,8 -	24,3	< 0,0001
BALC	ohne Vit. D / mit Vit. D	21	17,2	13,4 -	21,0	< 0,0001

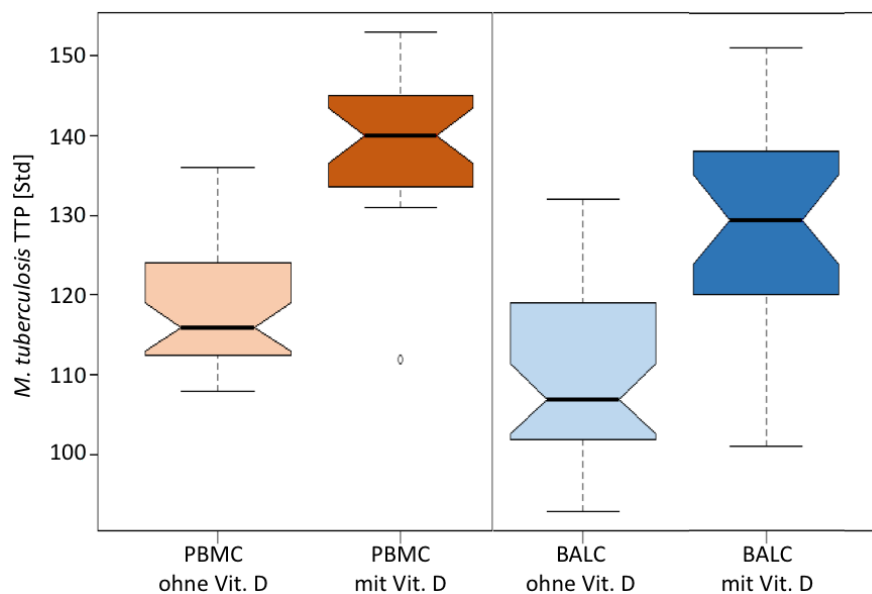


Abbildung 15 – Effekt von Vitamin D in PBMC und BALC in TTP

Abgebildet ist der Effekt von Vitamin D₃ 1 α , 25 (OH)₂ Cholecalciferol (Vit. D) in unterschiedlichen Zellgruppen im mycobacterial growth indicator tube (MGIT) in Zeit bis zur Kulturpositivität (time to culture positivity; TTP) in Std. Der Effekt des Vit. D vor und nach der *Mycobacterium* (M.) *bovis* *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-Impfung ist als gekerbter Boxplot dargestellt. Die Wachstumsgeschwindigkeit von *M. tuberculosis* H37Rv wurde nach infizierten Zellgruppen stratifiziert:

orange/rot: periphere, mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC)

hellblau/dunkelblau: Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC)

—: Die schwarze Linie zeigt den Median.

Notch: Die Kerbungen (Notches) zeigen das 95 % Konfidenzintervall.

In den CFU-Ergebnissen wurden kohärente Ergebnisse gefunden. Die Anzahl der gezählten Kolonien verringerte sich sowohl in PBMC als auch in BALC, wenn dem Assay Vitamin D hinzugefügt wurde (PBMC β - 0,441 Log₁₀ CFU; 95 % KI: - 0,524 bis - 0,359; $p < 0,0001$; BALC β - 0,266; 95 % KI: - 0,348 bis - 0,184; $p < 0,0002$, siehe Tabelle 11 und Abbildung 16).

Tabelle 11 – Effekt von Vitamin D in PBMC und BALC in Log₁₀ CFU

Abgebildet ist der Effekt von Vitamin D₃ 1 α , 25 (OH)₂ Cholecalciferol (Vit. D) -Effekt in peripheren, mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) und Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC) auf Festagar in Log₁₀ Koloniebildende Einheiten (colony forming units; CFU). Angegeben wurden Schätzer (β), Konfidenzintervall (KI) und der Signifikanzwert (probability; p).

Analysierte Gruppe	Vergleich	β	95 % KI		p-Wert
PBMC	ohne Vit. D / mit Vit. D	-0,441	-0,524	-0,359	< 0,0001
BALC	ohne Vit. D / mit Vit. D	-0,266	-0,348	-0,184	< 0,0002

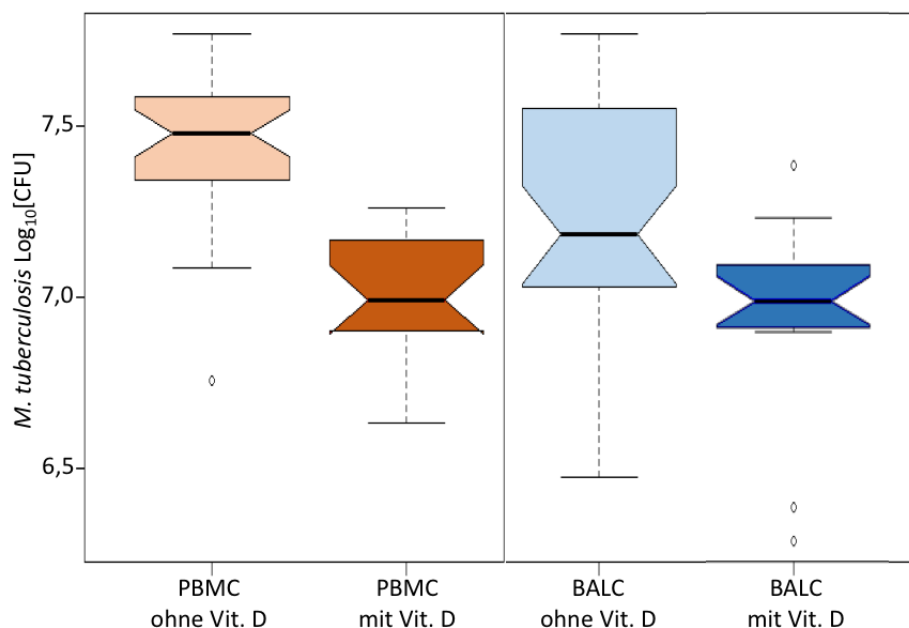


Abbildung 16 – Effekt von Vitamin D in PBMC und BALC in Log₁₀ CFU

Abgebildet ist der Effekt von Vitamin D₃ 1 α , 25 (OH)₂ Cholecalciferol (Vit. D) in unterschiedlichen Zellgruppen in Log₁₀ Koloniebildende Einheiten (colony forming units; CFU) auf Festagar. Der Effekt des Vit. D vor und nach der *Mycobacterium* (M.) *bovis* *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-Impfung wurde als Boxplot dargestellt. Die Wachstumsgeschwindigkeit von *M. tuberculosis* H37Rv wurde nach infizierten Zellgruppen stratifiziert:

orange/rot:	periphere, mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC)
hellblau/dunkelblau:	Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC)
—:	Die schwarze Linie zeigt den Median.
Notch:	Die Kerbungen (Notches) zeigen das 95 % Konfidenzintervall.
Boxplot:	Die Figur oberhalb und unterhalb des Median (Boxplot) ist durch die 75. bzw. 25. Perzentile des Interquartilsabstand (interquartile range; IQR) definiert.
Barchart:	Die gestrichelten Balken (Barchart) zeigen den Gesamtbereich der Messdaten.

4.6 Lyseversuche

4.6.1 Lyseversuch mit PBMC

Der Lyseversuch wurde eingeführt um zu untersuchen, ob die Mykobakterien intakte Zellen für die Vermehrung benötigen oder lediglich freie Zellbestandteile.

In dem Inokulum zeigten die Mykobakterien im Vergleich zu den lysierten PBMC ein ähnlich langsames Wachstum (Inokulum Median 146 Std., lysierte PBMC 140 Std., respektive; β - 2,4 Std., 95 % KI: - 5,9 bis 1,2, $p = 0,1980$). Die Mykobakterien wuchsen in den vitalen PBMC-Kulturen schneller (Median 120 Std.; vitale PBMC zu Inokulum β - 25,5 Std., 95 % KI: - 28,5 bis - 22,55; $p < 0,0001$; vitale PBMC zu lysierte PBMC β - 23,4 Std., 95 % KI: - 27,3 bis - 19,4; $p < 0,0001$, siehe Tabelle 12 und Abbildung 17).

Tabelle 12 – Effekt der Zellvitalität in PBMC in TTP

Aufgetragen ist der Effekt der Zellvitalität in peripheren, mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) in mycobacterial growth indicator tube (MGIT) in Zeit bis zur Kulturpositivität (time to culture positivity; TTP) in Std.. Angegeben wurden Schätzer (β), Konfidenzintervall (KI) und der Signifikanzwert (probability; p).

Analysierte Gruppe	Vergleich	β	95 % KI		p-Wert
PBMC	ohne Zellen / lysierte PBMC	-2,4	-5,9 -	1,2	0,1980
PBMC	ohne Zellen / vitale PBMC	-25,5	-28,5 -	-22,5	< 0,0001
PBMC	vitale PBMC / lysierte PBMC	-23,4	-27,3 -	-19,4	< 0,0001

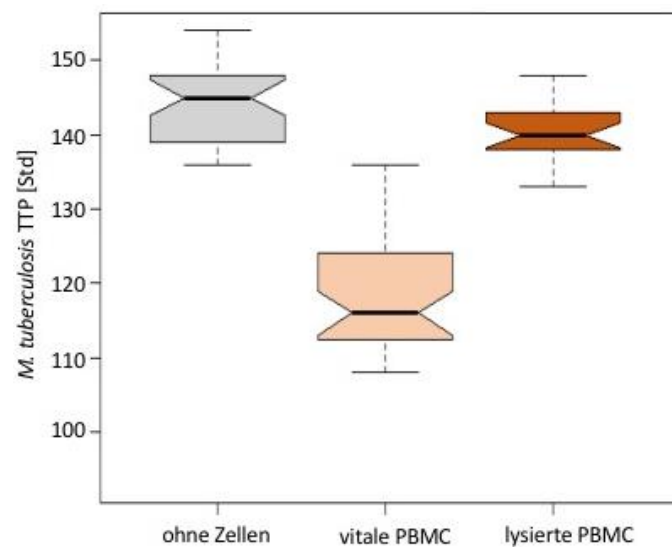


Abbildung 17 – Effekt der Zellvitalität in PBMC in TTP

Abgebildet ist der Effekt der Zellvitalität in peripheren, mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) in mycobacterial growth indicator (MGIT) in Zeit bis zur Kulturpositivität (time to culture positivity; TTP) in Std. Der Effekt des Vitamin D₃ (1 α , 25 (OH)₂ Cholecalciferol) (Vit. D) wurde vor und nach der *Mycobacterium* (M.) *bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-Impfung als gekerbter Boxplot dargestellt.

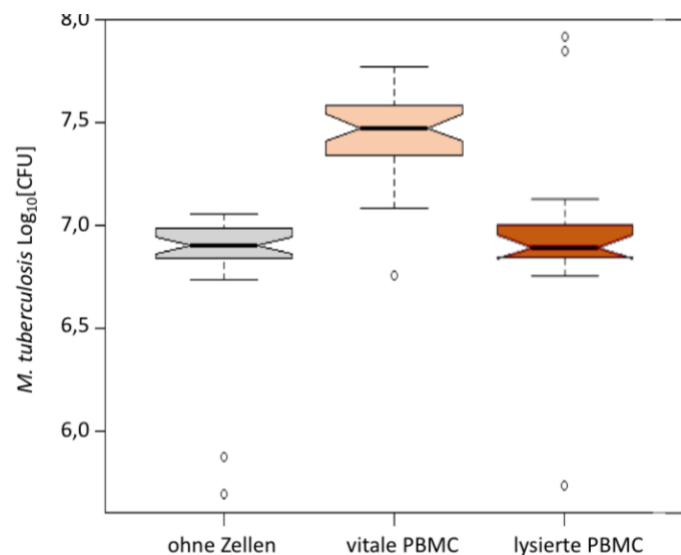
- : Die schwarze Linie zeigt den Median.
- Notch: Die Kerbungen (Notches) zeigen das 95 % Konfidenzintervall.
- Boxplot: Die Figur oberhalb und unterhalb des Median (Boxplot) ist durch die 75. bzw. 25. Perzentile des Interquartilsabstand (interquartile range; IQR) definiert.
- Barchart: Die gestrichelten Balken (Barchart) zeigen den Gesamtbereich der Messdaten.

Diese Ergebnisse zeigten sich kohärent bei Auswertung der CFU. Das Inokulum zeigte ähnlich wenig auszählbare Kolonien wie die lysierten Zellen (β +0,088 Log₁₀ CFU, 95 % KI: - 0,042 bis 0,218; p = 0,1930). Jeweils mehr Kolonien fanden sich in den vitalen Zellen im Vergleich zum Inokulum (β +0,579 Log₁₀ CFU, 95 % KI: 0,470 bis 0,689; p < 0,0001) oder zu den lysierten Zellen (β +0,494 Log₁₀ CFU, 95 % KI: bis -19,4; p < 0,0001, siehe Tabelle 13 und Abbildung 18).

Tabelle 13 – Effekt der Zellvitalität in PBMC in Log₁₀ CFU

Aufgetragen ist der Effekt der Zellvitalität in peripheren, mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) in Log₁₀ Koloniebildende Einheiten (colony forming units; CFU) auf Festagar. Angegeben wurden Schätzer (β), Konfidenzintervall (KI) und der Signifikanzwert (probability; p).

Analysierte Gruppe	Vergleich	β	95 % KI		p-Wert
PBMC	ohne Zellen / lysierte PBMC	0,088	-0,042 -	0,218	0,1930
PBMC	ohne Zellen / vitale PBMC	0,579	0,470 -	0,689	< 0,0001
PBMC	vitale PBMC / lysierte PBMC	0,494	0,354 -	0,634	< 0,0001

Abbildung 18 – Effekt der Zellvitalität in PBMC in Log₁₀ CFU

Abgebildet ist der Effekt der Zellvitalität in PBMC auf Festagar in Log₁₀ Koloniebildende Einheit (colony forming unit; CFU). Die Wachstumsgeschwindigkeit von *Mycobacterium* (M.) *tuberculosis* wurde als gekerbter Boxplot in Bezug auf die Zellvitalität in dem zellfreien Inokulum (grau), in vitalen (orange) peripheren, mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) oder in lysierten PMBC (rot) dargestellt.

- : Die schwarze Linie zeigt den Median.
- Notch: Die Kerbungen (Notches) zeigen das 95 % Konfidenzintervall.
- Boxplot: Die Figur oberhalb und unterhalb des Median (Boxplot) ist durch die 75. bzw. 25. Perzentile des Interquartilsabstand (interquartile range; IQR) definiert.
- Barchart: Die gestrichelten Balken (Barchart) zeigen den Gesamtbereich der Messdaten.

4.6.2 Lyseversuch mit BALC

In den BALC wuchsen die Mykobakterien im Inokulum am langsamsten (Median 146 Std.). Mit 129 Std. wuchsen sie in den lysierten BALC schneller (Inokulum zu lysierten BALC β - 21,1 Std., 95 % KI: - 25,4 bis - 16,8, $p < 0,0001$) und am schnellsten mit 110 Std. in den vitalen BALC (lysierte zu vitalen BALC β -12,1 Std., 95 % KI: - 16,9 bis - 7,4, $p = 0,0001$, siehe Tabelle 14 und Abbildung 19).

Tabelle 14 – Effekt der Zellvitalität in BALC in TTP

Aufgetragen ist der Effekt der Zellvitalität in Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC) im mycobacterial growth indicator tube (MGIT) in Zeit bis zur Kulturpositivität (time to culture positivity; TTP) in Std.. Angegeben wurden Schätzer (β), Konfidenzintervall (KI) und der Signifikanzwert (probability; p).

Analysierte Gruppe	Vergleich	β	95 % KI		p-Wert
BALC	ohne Zellen / lysierte BALC	-21,1	-25,4 -	-16,8	< 0,0001
BALC	ohne Zellen / vitale BALC	-33,2	-36,2 -	-30,2	< 0,0001
BALC	vitale BALC / lysierte BALC	-12,1	-16,9 -	-7,4	< 0,0001

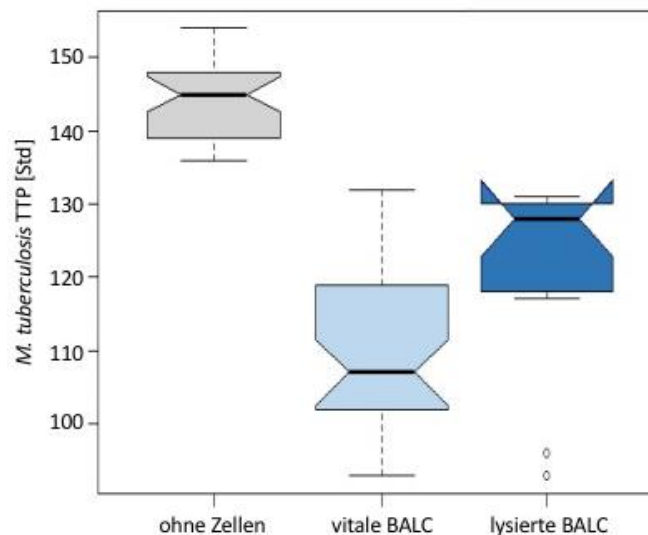


Abbildung 19 – Effekt der Zellvitalität in BALC in TTP

Abgebildet ist der Effekt der Zellvitalität in Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC) im mycobacterial growth indicator tube (MGIT) in Zeit bis zur Kulturpositivität (time to culture positivity; TTP). Dargestellt ist ein gekerbter Boxplot in Bezug auf die Zellvitalität. Die

Wachstumsgeschwindigkeit von *Mycobacterium* (M.) *tuberculosis* H37Rv wurde in Std. in dem zellfreien Inokulum (grau), in vitalen (hellblau) Zellen der oder in lysierten BALC (dunkelblau) gemessen.

- : Die schwarze Linie zeigt den Median.
 Notch: Die Kerbungen (Notches) zeigen das 95 % Konfidenzintervall.
 Boxplot: Die Figur oberhalb und unterhalb des Median (Boxplot) ist durch die 75. bzw. 25. Perzentile des Interquartilsabstand (interquartile range; IQR) definiert.
 Barchart: Die gestrichelten Balken (Barchart) zeigen den Gesamtbereich der Messdaten.

In den CFU-Ergebnissen fanden sich bei Inokulum und lysierten Zellen gleichermaßen weniger Kolonien (Inokulum zu lysierten BALC $\beta + 0,025 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$, 95 % KI: - 0,121 bis 0,170; $p = 0,7370$). Mehr Kolonien fanden sich in den vitalen Zellen (Inokulum zu vitalen BALC $\beta + 0,359 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$, 95 % KI: - 0,250 bis 0,468; $p = 0,0001$, lysierte zu vitalen BALC $\beta + 0,346 \text{ Log}_{10} \text{ CFU}$, 95 % KI: - 0,190 bis 0,504; $p = 0,0001$, siehe Tabelle 15 und Abbildung 20).

Tabelle 15 – Effekt der Zellvitalität in BALC in $\text{Log}_{10} \text{ CFU}$

Aufgetragen ist der Effekt der Zellvitalität in Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC) in Log_{10} Koloniebildende Einheit (colony forming units; CFU) auf Festagar. Angegeben wurden Schätzer (β), Konfidenzintervall (KI) und der Signifikanzwert (probability; p).

Analysierte Gruppe	Vergleich	β	95 % KI		p-Wert
BALC	ohne / lysierte BALC	0,025	- 0,121 -	0,170	0,7370
BALC	ohne / vitale BALC	0,359	0,250 -	0,468	< 0,0001
BALC	vitale BALC / lysierte BALC	0,346	0,190 -	0,504	< 0,0001

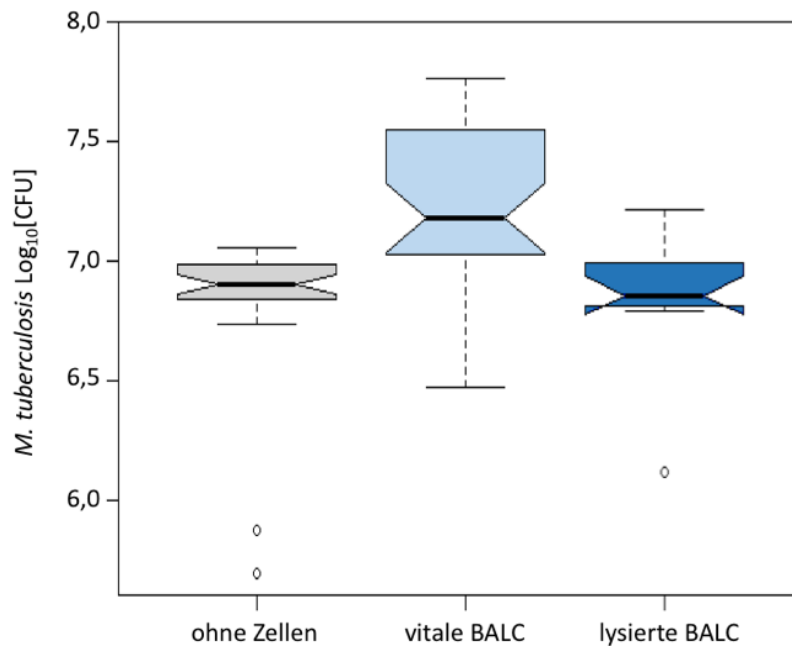


Abbildung 20 – Effekt der Zellvitalität in BALC in Log₁₀ CFU

Abgebildet ist der Effekt der Zellvitalität in Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC) auf Festagar in Log₁₀ Koloniebildende Einheit (colony forming unit; CFU). Es wurde die Wachstumsgeschwindigkeit von *Mycobacterium* (M.) *tuberculosis* H37Rv als ein gekerbter Boxplot in Bezug auf die Zellvitalität dargestellt.

- : Die schwarze Linie zeigt den Median.
- Notch: Die Kerbungen (Notches) zeigen das 95 % Konfidenzintervall.
- Boxplot: Die Figur oberhalb und unterhalb des Median (Boxplot) ist durch die 75. bzw. 25. Perzentile des Interquartilsabstand (interquartile range; IQR) definiert.
- Barchart: Die gestrichelten Balken (Barchart) zeigen den Gesamtbereich der Messdaten.

4.7 Differentialzytologie zwischen Blut und Lavage

Die Auswertung der zytologischen Differenzierung der BALC (Tabelle 16) zeigte eine Dominanz der mononukleären Zellen mit ca. 90 % Monozyten/Alveolarmakrophagen und < 10 % Lymphozyten in der BAL, sowie einer sehr geringen Anzahl an Granulozyten (< 3 %) im Vergleich zum Blut (3-7 % Monozyten, 24-45 % Lymphozyten, 53-75 % Granulozyten (4)). Die Lavagezytologie der Probanden entsprach der Normalverteilung der BAL aus der Literatur (103). Es zeigte sich eine relative Erhöhung der Makrophagen zulasten einer relativen Verringerung der Lymphozyten nach der Impfung (Tabelle 16).

Tabelle 16 – Effekt der *M. bovis* BCG-Impfung auf die Zelldifferenzierung der BALC

Dargestellt ist der Effekt der Impfung auf Gesamtzellzahl und Zelldifferenzierung der Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC). Angegeben wurden die Anzahl (n) in Prozent (%) als der Median, der Interquartilabstand (IQR) und der Signifikanzwert (probability; p).

	vor Impfung (n=19) % (Median, IQR)	nach Impfung (n=17) % (Median, IQR)	p-Wert
Gesamtzellzahl BALC/100ml BAL	6,7 (4,9-11,3)	10,4 (4,4-15,8)	0,1690
Makrophagen	89,0 (86,5-93,0)	95 (91-97)	0,0063
Lymphozyten	8,0 (6,5-11,5)	3 (2-7)	0,0011
Neutrophile	2,0 (1,0-3,0)	2 (1-2)	0,4530
Eosinophile	0 (0 %)	1 (5,9 %)	0,4430 [§]

[§]McNemar Test

4.8 IGRA ELISpot

Die immunologische Gedächtnisleistung wurde als antigen-spezifische Immunantwort nach Antigenkontakt im IGRA ELISpot, vor und nach der *M. bovis* BCG-Impfung, gemessen. Initial waren, durch die Einschlusskriterien definiert, alle Probanden negativ in ihrer Immunantwort im ELISpot auf die beiden *M. tuberculosis*-spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10, sowie das allgemeine Mykobakterienantigen PPD. Ein Kontakt der Probanden zu Mykobakterien ließ sich zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses also nicht nachweisen. Nach der Impfung zeigte der Großteil der Probanden eine induzierte Immunantwort im ELISpot. 10 von 17 (59 %) Probanden hatten nach der Impfung eine positive Reaktion in PPD und 4 (24 %) weitere Probanden zeigten positive Ergebnisse in ESAT-6 und/oder CFP-10. Die Effekte der Impfung auf den IGRA ELISpot sind in Tabelle 17 und in Abbildung 21 aufgeführt.

Tabelle 17 – Effekt der *M. bovis* BCG-Impfung auf die PPD-Immunantwort im IGRA ELISpot

Dargestellt ist der Effekt der *Mycobacterium (M.) bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG)- Impfung auf die Immunantwort im interferon-gamma release assay (IGRA) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISpot). In der Tabelle ist die spezifische Immunantwort der peripheren, mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) auf die einzelnen Antigene Purified Protein Derivate (PPD), early secreted antigenic target 6 kDa (ESAT-6) und culture filtrate protein 10 kDa (CFP-10) einzeln und die Schnittmenge der spezifischen Immunantwort erfasst.

Spezifische positive Immunantwort in PBMC	vor Impfung (n=19) n (%)	nach Impfung (n=17) n (%)	p-Wert
positive Immunantwort in ESAT-6, CFP-10 oder PPD	0 (0,0)	14 (82,4)	<0,0001 [#]
ESAT-6	0 (0,0)	5 (29,4)	<0,0001 [#]
CFP-10	0 (0,0)	6 (35,3)	<0,0001 [#]
PPD	0 (0,0)	10 (58,8)	< 0,0001 [#]

[#] exakter Fisher-Test zum Vergleich zweier Raten

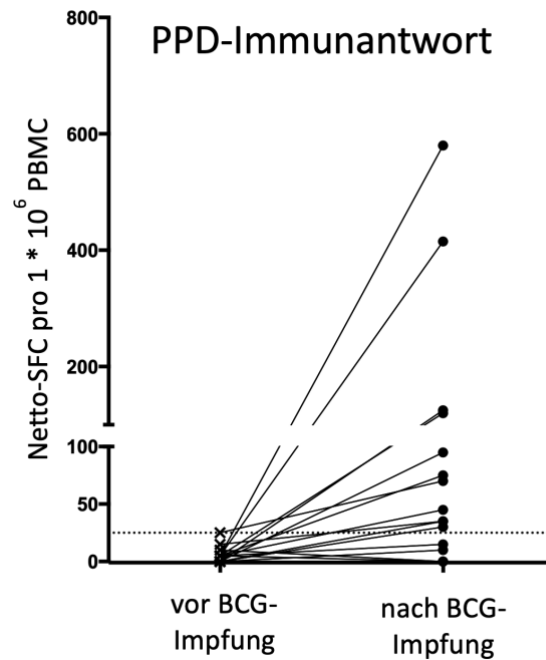


Abbildung 21 – PPD-Immunantwort vor und nach *M. bovis* BCG-Impfung in PBMC

Grafisch dargestellt ist die Veränderung der Purified Protein Derivate (PPD)-Immunantwort vor und nach der *Mycobacterium* (*M.*) *bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-Impfung. Gezeigt ist die Änderung als gemessene Anzahl der, durch PPD-Stimulation, Interferon gamma ($\text{IFN-}\gamma$) produzierenden T-Zellen (spot forming cells; SFC) aus dem peripheren, mononukleären Blutzellen (peripheral mononuclear blood cells; PBMC) im interferon-gamma release assay (IGRA) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISpot). Netto-SFC pro $1 \cdot 10^6$ PBMC bedeutet, dass die Ergebnisse von der Höhe der unspezifischen Vorstimulation bereinigt wurden und auf eine Mio. Zellen extrapoliert wurden.

4.8.1 IGRA und MGIA im Vergleich

Um die Kernfrage zu beantworten, ob die Wachstumskontrolle von *M. tuberculosis* H37Rv nach der *M. bovis* BCG-Impfung durch eine T-Zell Immunantwort beeinflusst wird, ist die PPD-Immunantwort im ELISpot gegen die Wachstumshemmung im MGIA ausgewertet worden (siehe Abbildung 22). Die Änderung der Zeit bis zur Kulturpositivität in TTP im MGIA wurde als TTP-Verhältnis berechnet: als Rate vor-Impfung zu nach-Impfung. Die gepunktete Linie auf der y-Achse zeigt ein Verhältnis von 1.0, was die gleiche TTP für das Wachstum von *M. tuberculosis* H37Rv vor und nach der Impfung anzeigt. Ein Verhältnis > 1.0 steht für ein verringertes Mykobakterienwachstum (Zunahme der TTP im zweiten MGIA nach der BCG-Impfung) und ein Verhältnis < 1.0 steht für ein erhöhtes Mykobakterienwachstum (Abnahme des TTP im zweiten MGIA nach der BCG-Impfung). Die

TTP in BALC ist in Abbildung 22 in blauen Quadraten dargestellt, die TTP in PBMC in roten Dreiecken.

Vor der Impfung hatte kein Teilnehmer immunologisch nachweisbaren Kontakt zu Mykobakterien. Alle Probanden hatten im IGRA ELISpot eine negative Immunantwort gemessen als IFN- γ Freisetzung der T-Zellen im IGRA auf PPD-Stimulation. Auf der x-Achse wurde eine Änderung der Immunantwort vor und nach der *M. bovis* BCG-Impfung als Erhöhung der Netto-SFC pro eine Mio. PBMC im IGRA-ELISpot acht Wochen nach der Impfung angegeben. Die gestrichelte Linie zeigt einen Anstieg von 25 Netto-SFC pro eine Mio. PBMC. Netto-SFC pro $1 \cdot 10^6$ PBMC bedeutet, dass die Ergebnisse von der Höhe der unspezifischen Vorstimulation bereinigt wurden und auf eine Mio. Zellen extrapoliert wurden. Ein Anstieg von weniger als 25 Netto-SFC im IGRA bedeutet, dass die Immunantwort nach der *M. bovis* BCG-Impfung bei diesen Individuen weiterhin negativ blieb, während die *M. bovis* BCG-Impfung bei den Individuen, die einen Anstieg von mehr als 25 Netto-SFC hatten, eine positive IGRA-Reaktion provozierte.

Probanden, deren Ergebnisse im oberen rechten Quadranten liegen, haben nach der Impfung eine erfolgreiche Immunantwort gezeigt (bessere Wachstumskontrolle bei *M. tuberculosis* H37Rv und eine neue positive Zytokinimmunantwort), wohingegen Probanden im rechten unteren Quadranten eine neue positive Zytokinimmunantwort hatten, die jedoch keine verbesserte Wachstumskontrolle im MGIA zeigten. Der obere linke Quadrant zeigt eine bessere Wachstumskontrolle ohne adaptive Immunantwort an. Diese Streuung der Ergebnisse zeigt den Mangel an Korrelation der Immunreaktionen und der gemessenen Wachstumskontrolle im MGIA.

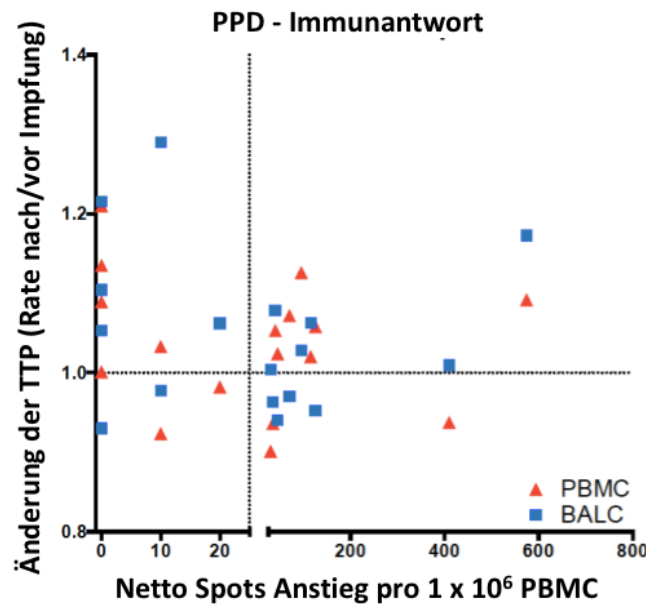


Abbildung 22 – Korrelation zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und *M. tuberculosis*-spezifischer Immunantwort

Auf der y-Achse grafisch dargestellt ist die Änderung der Messergebnisse im mycobacterial growth inhibition assay (MGIA) in Zeit bis zur Kulturpositivität (time to culture positivity; TTP) in Std. als Rate vor/nach der *Mycobacterium* (*M.*) *bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-Impfung.

Auf der x-Achse ist der Anstieg der Punktbildenden Einheiten (spot-forming-cell; SFC) als Netto-SFC pro eine Mio. Zellen aus peripheren, mononukleären Zellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) vor und nach *M. bovis* BCG-Impfung dargestellt. Der Anstieg der Purified Protein Derivate (PPD)-Immunantwort wurde durch eine Veränderung der T-Zell Immunantwort beeinflusst und wurde als Steigerung der Interferon-gamma (IFN- γ)-Produktion im interferon-gamma release assay (IGRA) enzyme-linked immunospot assay (ELISpot) ermittelt.

Die gepunktete Linie auf der y-Achse zeigt ein Verhältnis von 1.0, was die gleiche TTP für das Wachstum von *M. tuberculosis* H37Rv vor und nach der Impfung anzeigt. Ein Verhältnis > 1.0 steht für ein verringertes Mykobakterienwachstum (Zunahme der TTP im zweiten MGIA nach der BCG-Impfung) und ein Verhältnis < 1.0 steht für ein erhöhtes Mykobakterienwachstum (Abnahme des TTP im zweiten MGIA nach der BCG-Impfung). Die TTP-Änderung der Zellen der bronchoalveolären Lavage (bronchoalveolar lavage cells; BALC) im MGIA ist in blauen Quadraten dargestellt, die TTP-Änderung der PBMC im MGIA in roten Dreiecken.

Vor der Impfung hatten alle Teilnehmer ein negatives Ergebnis im IGRA ELISpot, weshalb auf der x-Achse der Netto-SFC dieser Abbildung ausschließlich eine Konstanz oder Steigerung der Werte abgebildet sind. Die Änderung der PPD-Immunantwort vor und nach der *M. bovis* BCG-Impfung wurde als Erhöhung der Netto-SFC pro eine Mio. PBMC im IGRA-ELISpot acht bis zehn Wochen nach der Impfung ermittelt. Die gestrichelte Linie zeigt einen Anstieg von 25 Netto-SFC pro eine Mio. PBMC. Ein Anstieg von weniger als 25 Netto-SFC im IGRA bedeutet, dass die Immunantwort nach der *M. bovis* BCG-Impfung bei diesen Individuen negativ blieb, während die *M. bovis* BCG-Impfung bei den Individuen, die einen Anstieg von mehr als 25 Netto-SFC hatten, eine positive IGRA-Reaktion provozierte. Probanden, deren Ergebnisse im oberen rechten Quadranten liegen, haben nach der Impfung eine erfolgreiche Immunantwort gezeigt (bessere Wachstumskontrolle bei *M. tuberculosis* H37Rv und eine neue positive Zytokinimmunantwort), wohingegen Probanden im rechten unteren Quadranten eine neue positive Zytokinreaktion hatten, die jedoch keine verbesserte Wachstumskontrolle im MGIA zeigte. Der obere linke Quadrant zeigt eine bessere Wachstumskontrolle ohne adaptive Immunantwort an.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Monozyten/Makrophagen nach einer Vakzinierung von gesunden Probanden in der Lage sind, das Wachstum von *M. tuberculosis* H37Rv *ex vivo* besser zu kontrollieren als vor der Vakzinierung, ob sich ein solcher Effekt gegebenenfalls zwischen PBMC und BALC unterscheidet und ob er mit der Induktion Mykobakterien-spezifischer, IFN- γ produzierender T-Lymphozyten im peripheren Blut korreliert. Dafür wurde die Methode des MGIA erstmals an humanen Lungenzellen (BALC) angewendet.

Das Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass durch die Impfung mit *M. bovis* BCG die Fähigkeit der Wachstumskontrolle von *M. tuberculosis* H37Rv in PBMC und BALC *ex vivo* nicht beeinflusst wird. Insbesondere gibt es keinen Zusammenhang zwischen einer induzierten T-Zell Immunantwort durch die *M. bovis* BCG-Impfung und der Wachstumsgeschwindigkeit von *M. tuberculosis* H37Rv in PBMC/BALC *ex vivo*. Nach experimenteller Infektion mit *M. tuberculosis* H37Rv wachsen die Tuberkulosebakterien schneller in BALC als in PBMC. Möglicherweise sind BALC für eine Infektion mit *M. tuberculosis* H37Rv vulnerabler als PBMC.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine intrakutane Impfung mit *M. bovis* BCG keinen Effekt auf die pulmonale Immunkontrolle gegenüber einer Infektion mit *M. tuberculosis* H37Rv hat und die periphere Immunantwort kein Surrogatmarker für einen Impfschutz darstellt. Die Ergebnisse bestätigen in einem *ex vivo* Infektionsmodell an humanen Lungenzellen epidemiologische Daten, die keinen substantiellen Schutz der *M. bovis* BCG Impfung vor einer Lungentuberkulose belegen.

5.1 Effekte auf das Wachstum von *M. tuberculosis ex vivo* im MGIA

5.1.1 Wachstumsunterschiede vor und nach *M. bovis* BCG-Impfung

Bei Erregerkontakt kommt es im Rahmen der angeborenen Immunabwehr initial zu einer Phagozytose von Mykobakterien und dem Versuch, diese intrazellulär abzutöten. Ein Maß der Immunkontrolle ist demnach die Fähigkeit der Zellen, die intrazellulären Mykobakterien in ihrem Wachstum zu kontrollieren (70). Dazu wurden bislang Zellen nach der *M. tuberculosis* H37Rv-Infektion lysiert, auf Agarplatten ausgestrichen und das

Wachstum als Anzahl der gebildeten Bakterienkolonien in CFU bestimmt (71, 76). Ein anderes Testsystem, welches die physiologischen Bedingungen der Infektion von BALC *ex vivo* nachbilden kann, ist der MGIA (104-107). Bei dieser Methode zur Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit/-kontrolle wird die Wachstumsdauer bis zur Kulturpositivität in TTP gemessen und als Zeit in Stunden ermittelt.

Es zeigt sich in dieser Arbeit, dass die Wachstumsgeschwindigkeit von *M. tuberculosis* H37Rv, weder als TTP noch als CFU gemessen, durch die *M. bovis* BCG-Impfung beeinflusst wird.

Die unzureichende Wachstumskontrolle nach *M. bovis* BCG-Impfung ist durch epidemiologische Daten eines limitierten Schutzes vor einer Tuberkulose in Niedriginzidenzländern belegt (44, 45). In der klinischen Praxis schützt die *M. bovis* BCG-Impfung in der Regel nicht vor einer Infektion mit *M. tuberculosis*, sondern kann nur den Schweregrad der Erkrankung reduzieren, da sie z.B. die Rate der Miliartuberkulose und das Auftreten einer tuberkulösen Meningitis verringern kann (44, 108-111). Dieser Effekt ist in den ersten zwei Lebensjahren am größten (110), weswegen in den Hochinzidenzländern der Tuberkulose die BCG-Impfung auch weiterhin in den ersten Lebensstagen der Neugeborenen durchgeführt wird (108). Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung dieses altersabhängigen Effektes wäre ein Immunschutz vor einer Infektion mit Tuberkulose durch den Kontakt zu NTM, der im Laufe der Kindheit erworben wird. Nur bei Säuglingen ohne Kontakt zu NTM würde die *M. bovis* BCG-Impfung folglich noch diesen messbar höheren Immunschutz auslösen. Für diese Erklärung spricht auch, dass die Wirkung der *M. bovis* BCG-Impfung weltweit gesehen lokale Unterschiede zeigt. Der Immunschutz der Impfung ist in kalten Regionen der Welt, in denen möglicherweise der Kontakt zu Umweltmykobakterien seltener stattfindet, größer (112).

5.1.2 Wachstumsunterschiede in PBMC und BALC

Das mykobakterielle Wachstum im MGIA wurde für humane Zellen bereits in Anwesenheit von Vollblut (113, 114) oder PBMC (115) untersucht. Die Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen, die eine längere Inkubationszeit erfordert, wurde bereits in solchen mykobakteriellen Funktionsuntersuchungen berücksichtigt und es wurden ausdifferenzierte T-Zellen verzögert hinzugefügt (113). Auch Limitationen durch eine

Immundepression mit HIV und die resultierenden Einflüsse auf einen funktionellen Infektionsassay wurden bereits untersucht (116). Somit lassen sich verschiedene Situationen der Tuberkuloseerkrankung mit unterschiedlichen zugrundeliegenden Pathomechanismen im MGIA *ex vivo* nachbilden.

Das Wachstum von *M. tuberculosis* H37Rv im MGIA wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals simultan in BALC und PBMC untersucht, um die Bedingungen im Kompartiment der menschlichen Lunge mit dem Kompartiment des Blutes vergleichen zu können. Es zeigt sich, dass *M. tuberculosis* in BALC im MGIA schneller repliziert als in PBMC. Diese Resultate, der höheren Suszeptibilität der BALC *ex vivo* im Vergleich zu den PBMC, stützen die Beobachtungen im klinischen Verlauf, dass eine Tuberkuloseinfektion als häufigste Organbeteiligung die Lunge betrifft und sich nicht regelhaft systemisch im Organismus ausbreitet.

BALC sind gewebespezifisch differenzierte Zellen, die spezielle Rezeptoren exprimieren (117), die sich bei Monozyten nicht nachweisen lassen (118). Es ist daher möglich, dass der Ort der Infektion zu einer evolutionären Koentwicklung zwischen *M. tuberculosis* und Abwehrzellen geführt hat. Andere mögliche Gründe für die höhere Anfälligkeit im Kompartiment Lunge könnten unterschiedliche Bedingungen in der Lungenmukosa im Vergleich zum Blut sein, wie pH-Wert oder die mukoziliäre Clearance, die einen Einfluss auf die Infektionswahrscheinlichkeit mit Mykobakterien haben (119, 120).

Diese Ergebnisse unterstützen erneut, dass es sich um unterschiedliche immunologische Kompartimente handelt und Forschungsergebnisse aus Blut nicht repräsentativ für das Kompartiment Lunge sind. Als Schlussfolgerung dieser Annahme gibt es in den letzten Jahren bei den Applikationsformen der Impfstoffe neue Forschungsansätze, die Vakzine lokal zu applizieren. Nachdem 2013 der vielversprechende Impfstoffkandidat MVA85A in einer Phase IIb Studie mit intradermalen Applikation scheiterte (63), wird aktuell seine Verträglichkeit und Wirksamkeit als Dosieraerosol untersucht (90).

5.1.3 Korrelation zwischen Wachstumsgeschwindigkeit und spezifischer Immunantwort
Parallel zur Bestimmung der Wachstumskontrolle durch Monozyten/Makrophagen, wurde die adaptive T-Zell Immunantwort untersucht. Sobald Makrophagen Zellbestandteile der Mykobakterien auf ihrer Oberflächenmembran präsentieren, können T-Zellen die

entsprechenden fremden Antigene binden und sich ausdifferenzieren. Eine Untergruppe der T-Lymphozyten, die TH1 CD4-positiven T-Helferzellen, produzieren nach Stimulation durch Antigene eine Vielzahl Zytokine und einer dieser zellulären Botenstoffe ist das IFN- γ . Im ELISpot wird die Anzahl antigen-spezifischer IFN- γ produzierender T-Zellen als SFC quantifiziert. In früheren Studien zur Evaluierung der Effektivität von Vakzinkandidaten wurde angenommen, dass die Anzahl antigen-spezifischer IFN- γ produzierenden T-Zellen, bzw. die Menge des produzierten IFN- γ , im peripheren Blut mit der Fähigkeit dieser Zellen zur Wachstumskontrolle von *M. tuberculosis* korreliert (121-124).

In der vorliegenden Arbeit entwickeln mehr als die Hälfte der Probanden eine Konversion der PPD-spezifischen Immunantwort im ELISpot nach Impfung mit *M. bovis* BCG. Die Immunantwort im IGRA korreliert dabei jedoch nicht mit der ermittelten Wachstumshemmung im MGIA. Insbesondere induzierte die *M. bovis* BCG-Impfung keine Verbesserung der Immunkontrolle, die als mykobakterielle Wachstumsrate in TTP oder CFU messbar wäre. Die induzierbare Anzahl Antigen-spezifischer, IFN- γ produzierender T-Zellen ist demnach kein Surrogatmarker für den funktionellen Schutz vor einer Tuberkuloseinfektion.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten einer Phase IIb Studie überein, in der eine Vermehrung Antigen-spezifischer Lymphozyten nach Vakzinierung nicht mit der funktionellen Immunkontrolle der mykobakteriellen Infektion einherging. In dieser Studie wurde durch Impfung mit dem Antigen MVA85A zwar eine Antigen-spezifische IFN- γ Produktion induziert, dennoch waren die geimpften Kinder im Vergleich zu denen, die eine Placebo-Vakzine erhielten, nicht vor einer Tuberkulose geschützt (63).

5.2 Anwendung des IGRA ELISpot in Klinik und Forschung

Während der IGRA ELISpot in Vakzinstudien als Marker für die Detektion eines Schutzes vor einer Tuberkuloseinfektion (103-106) eingesetzt werden sollte, wird der Test klinisch jedoch zur Tuberkulosedagnostik benutzt (125, 126).

In der Diagnostik aus dem peripheren Blut allein ist der Test unzureichend, da jede fünfte Person die an einer aktiven Tuberkulose erkrankt ist, im IGRA falsch negativ bleibt (29, 30). Zudem kann selbst mit einer positiven Immunantwort nicht zwischen einer latenten Infektion, einer ausgeheilten Tuberkulose oder einer aktiven Erkrankung unterschieden

werden (29, 127-129). Der positive prädiktive Wert für die Erkrankung an einer Tuberkulose in einem Niedriginzidenzland liegt mit 0,7 % (beim TB-SPOT®.TB ELISpot) und 1,9 % (QuantiFERON®-TB-Gold Plus ELISA) suboptimal für die Detektion der Erkrankung (130). Lediglich in einer Studie korreliert die Höhe der Immunantwort mit dem Risiko zur Entwicklung einer Tuberkulose (29, 131). Eine bessere Differenzierung zwischen LTBI und aktiver Erkrankung erlaubt der Nachweis einer Anreicherung der *M. tuberculosis*-spezifischer Immunzellen am Ort der Infektion (132), so wie Silver et al. (133) es bereits 2003 *in vivo* durch lokale PPD-Installation in verschiedenen Lungensegmenten gezeigt haben. Generell ist die immunologische Diagnostik einer pulmonalen Tuberkuloseerkrankung aufgrund der lokalen Anreicherung spezifischer T-Zellen am Ort der Infektion in BALC sensitiver als in PBMC (25, 132). Wird die Kombination des Nukleinsäurenachweises mittels PCR und den immunologischen Nachweis mittels BAL-ELISpot genutzt, so kann die korrekte Diagnose der Lungentuberkulose in > 98 % der Fälle in zwei Tagen gestellt werden (25).

Aber sowohl in der klinische Diagnostik und noch seltener in der Forschung werden BALC untersucht, da die Bronchoskopie humaner Patienten bzw. Probanden ein invasives und aufwendiges Verfahren ist (siehe Kapitel 5.2 „Limitationen“) und BALC *ex vivo* schwierig in einer Zellkultur vital zu halten sind.

5.3 Funktionelle Wirkung von Vitamin D

Das Konzept, durch den MGIA eine funktionelle Immunkontrolle gegenüber *M. tuberculosis* nachzuweisen, ist zwar plausibel (113, 116), aber bislang nicht durch experimentelle Studien mit einer Positivkontrolle belegt. $1\alpha, 25(\text{OH})_2$ Cholecalciferol ist für seine immunmodulatorischen Effekte durch die Induktion einer antimikrobiellen Aktivität humaner Monozyten und Makrophagen, gegenüber *M. tuberculosis* bekannt (134-136). In einer vulnerablen Population mit genetischen Variationen des Vitamin D Signalweges konnte gezeigt werden, dass eine adjuvante Behandlung mit hochdosiertem Vitamin D die Zeit bis zur Kulturkonversion des Sputums beschleunigt (137). Mögliche zelluläre Mechanismen werden mit der Expression von Cathelicidin assoziiert (138). Es wurde gezeigt, dass mit der Aktivierung von Monozyten und Toll-like Rezeptoren (TLR)2/1-Liganden eine Vitamin D-abhängige Kaskade induziert wird. Dieser Weg führt zur

Aktivierung von Cathelicidin und zur erhöhten Aktivität phagozytierter Mykobakterien (139). Die antimikrobielle Wirkung der ausgelösten Kaskade durch die TLR war abhängig von der Anwesenheit von endogenem Vitamin D das zuvor in Monozyten und Makrophagen aktiviert worden war. Alternativ löste die exogene Zugabe von Vitamin D zu Monozyten und PBMC bereits in anderen Studien eine nachweisbare antimikrobielle Aktivität gegen intrazelluläre Mykobakterien aus (139, 140). Der immunmodulatorische Effekt von Vitamin D gegenüber Mykobakterien konnte in weiteren Studien nachgewiesen werden. So hatte Vitamin D einen Einfluss auf die Induktion verschiedener Matrix Metalloproteinasen (MMP) und induzierte die Sekretion von IL-10 und Prostaglandin E₂ (PGE₂) in PBMC (136). Die Hochregulation von Cathelicidin mit verbesserter Abtötung von intrazellulärem *M. tuberculosis* durch Aktivierung von TLR mit gesteigerter Expression von Vitamin D-1-Hydroxylase Genen (138, 139) konnte genauso wie die Vitamin D induzierte Steigerung der Expression der Stickoxidsynthase (141) nachgewiesen werden. Vitamin D ist in der Lage, Makrophagen so zu beeinflussen, dass die intrazelluläre Replikation von *M. tuberculosis* Erdman reduziert wird (142).

In der vorliegenden Studie wurden deswegen die Infektionsexperimente mit *M. tuberculosis* H37Rv in BALC und PBMC in Abhängigkeit von Vitamin D durchgeführt. Dabei sollte Vitamin D die Funktion einer Positivkontrolle erfüllen und die Testvalidität erhöhen. Es konnte gezeigt werden, dass BALC und PBMC das Wachstum der Tuberkulosebakterien in Anwesenheit von Vitamin D besser kontrollieren können. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass der fehlende Effekt durch die *M. bovis* BCG-Impfung nicht mit einem falsch negativen Ergebnis im MGIA erklärt werden kann, sondern deuten auf den tatsächlichen Mangel an protektiver Immunität nach *M. bovis* BCG-Impfung hin.

5.4 Lyseversuche

Für die Funktionalität des MGIA spricht weiterhin, dass Lyseexperimente belegen, wie die Vitalität von Zellen die Ergebnisse der MGIA-Untersuchungen beeinflusst. Lysierte BALC und PBMC haben dabei eine ähnliche Wachstumsrate von *M. tuberculosis* H37Rv wie im reinen Bakterieninokulum, in dem die Zellen komplett fehlen. Das bessere Wachstum der Mykobakterien in Anwesenheit vitaler Zellen bestätigt den Mechanismus der intrazellulären Vermehrung von *M. tuberculosis* (104) und unterstützt die Verwendung von

MGIA als funktioneller Assay. Zugleich überrascht, dass in den Lyseexperimenten mit BALC die Wachstumsgeschwindigkeit von *M. tuberculosis* H37Rv als TTP (Std.) auch in Gegenwart lysierter BALC noch schneller ist als in lysierten PBMC. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es Nährstoffe in der Lavage mit lysierten Zellen gibt, die sowohl im Zellkulturmedium wie auch in PBMC fehlen und das Wachstum von *M. tuberculosis* beschleunigen.

5.5 Limitationen

Diese Studie wird durch die Anzahl der Probanden und durch das Fehlen eines alternativen, effektiveren Impfstoffs für die Immun-Intervention limitiert. Da die *M. bovis* BCG-Impfung nicht zu einem ausreichenden Immunschutz vor einer Tuberkuloseinfektion führt (44, 45), lässt sich der Nutzen des MGIA als Surrogatmarker mit diesem Tuberkuloseimpfstoff nicht konkreter überprüfen.

Eine weitere Einschränkung im Studiendesign ist, dass die Analyse der induzierbaren Immunantwort mittels ELISpot nur mit PBMC und nicht zusätzlich mit BALC durchgeführt wurde. Dies hätte einen Vergleich der IGRA-Positivität der Zellpopulationen aus unterschiedlichen Kompartimenten erlaubt und mehr Informationen zur lokalen Immunantwort der Lunge gebracht. Jedoch ist die Menge an Zellen, die durch eine BAL gewonnen werden kann, begrenzt. Um die Aussagekraft des MGIA zu erhöhen, wurde die Bestimmung in Doppelansätzen durchgeführt. Zugunsten der Genauigkeit der MGIA-Ergebnisse wurde deswegen auf den ELISpot mit BALC verzichtet.

Zusätzlich wurde die *M. bovis* BCG-Impfung in dieser Studie intradermal durchgeführt, da dies die einzige in Deutschland zugelassene Applikationsform ist. Es ist bekannt, dass intradermal verabreichter *M. bovis* BCG-Impfstoff beim Menschen keinen besseren Schutz vor einer Tuberkuloseinfektion bei zeitgleich höheren Nebenwirkungsraten provoziert (143). Es ist spekulativ, ob die Verabreichung des *M. bovis* BCG-Impfstoffes mittels Aerosol oder die Applikation eines anderen Impfstoffkandidaten zu anderen Messergebnissen in der MGIA- oder der ELISpot-Immunantwort geführt hätte. Die Untersuchung zur Applikation von Impfstoffkandidaten mittels Dosieraerosol ist ein aktueller Forschungsansatz in der Entwicklung von Tuberkuloseimpfstoffen (90, 144).

In dieser Studie wurde der MGIA an humanen BALC angewendet. Diese neue Anwendung erfordert die kritische Einordnung und Reflektion der methodischen Limitationen und ist im Anhang 9.3 „Kritische Einordnung der Methoden“ detailliert diskutiert.

5.6 Fazit

Die Impfung von gesunden Freiwilligen mit *M. bovis* BCG bewirkt trotz der Entwicklung einer antimykobakteriellen Immunantwort im peripherem Blut keine *in vitro* Wachstumshemmung von *M. tuberculosis* H37Rv in humanen Alveolarmakrophagen, als repräsentative Zellen für den Ort der primären Infektion. Eine Impfstoff-spezifische IGRA-Immunantwort korreliert nicht mit einer Immunkontrolle für mykobakterielle Infektionen. Der IGRA ist somit kein geeigneter Surrogatmarker für die Vorhersage eines Impfschutz vor einer Tuberkulose (63). Diese Ergebnisse bieten damit eine experimentelle Erklärung der langjährigen klinischen Beobachtung, dass eine *M. bovis* BCG-Impfung nur unzureichend vor einer Lungentuberkulose schützt.

5.7 Ausblick

Der MGIA als Surrogatmarker für eine Korrelation zwischen Messergebnissen *in vitro* und dem Schutz vor einer Tuberkuloseinfektion *in vivo* kann nur mit einem nachweisbar wirksamen Tuberkuloseimpfstoff valide überprüft werden. Es gibt jedoch aktuell noch keinen in Deutschland zugelassenen Impfstoffkandidaten, der einen wirksamen Immunschutz vor einer neuen Tuberkuloseinfektion induziert (7). Nach der experimentellen Durchführung dieser Studie wurde nun erstmals für den Impfstoff M72/AS01_E eine effektive Immunprotektion von 54 % gezeigt, welche die Probanden vor der Konversion einer latenten Tuberkuloseinfektion in eine aktive pulmonale Tuberkulose schützt (61). Eine Überprüfung des MGIA vor und nach Impfung mit M72/AS01_E könnte die Aussagekraft des MGIA nachweisen. Es ist zu bedenken, dass die Quote von 0,6 % Erkrankten der Impfgruppe zu 1,2 % in der Kontrollgruppe zeigt, dass eine sehr große Probandenpopulation für ein signifikantes Ergebnis nötig wäre.

In einer anderen Tuberkulosevakzinstudie wird der bekannte *M. bovis* BCG-Impfstoff inhalativ appliziert (144). Die Aerosol-Applikation kann möglicherweise eine bessere lokale Immunität und darüber einen besseren Schutz induzieren. Diese lokalen Mechanismen können aber nur durch *ex vivo*-Experimente an den Zellen der Lunge studiert werden, wie sich durch die hier gezeigten Unterschiede z. B. in der Suszeptibilität zwischen Blut- und Lungenkompartiment nochmals bestätigt hat. Speziell für die Weiterentwicklung des MGIA als Surrogatmarker für den Impfschutz vor einer Tuberkuloseinfektion, hat sich in dieser Arbeit eine Überlegenheit von MGIT mit TTP gegenüber CFU als Kulturmedium gezeigt (siehe Kapitel 9.3.5 „Interpretation der unterschiedlichen Kultivierungssysteme MGIT und CFU“).

Auch wenn andere Kandidaten-Marker wie mRNA-Transkripte (145) als Korrelat für den Schutz vor *M. tuberculosis*-Infektionen vielversprechend erscheinen, können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als wertvoller Proof-of-Concept für zukünftige Impfstoffbewertungen dienen.

6 Zusammenfassung

Um die Tuberkulose (TB) zu eliminieren, wird dringend ein wirksamer Impfstoff benötigt, um die Infektion und/oder die Erkrankung mit *Mycobacterium (M.) tuberculosis* zu verhindern. Ein Haupthindernis für die Entwicklung neuer TB-Impfstoffe ist das Fehlen eines Surrogatmarkers für den Immunschutz gegen *M. tuberculosis*.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Wachstumsrate von *M. tuberculosis* H37Rv im mycobacterial growth inhibition assay (MGIA) als einen Marker für die mykobakterielle Wachstumskontrolle von bronchoalveolären Lavagezellen (BALC) und peripheren, mononukleären Blutzellen (PBMC) vor und nach der Impfung mit *M. bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) von gesunden erwachsenen Freiwilligen. Die Wachstumsraten nach der *ex vivo* Infektion der BAL und PBMC mit *M. tuberculosis* H37Rv wurde anhand der Kulturpositivität in Std. (TTP) in dem Flüssignährmedium (MGIT) und anhand der Anzahl Koloniebildender Einheiten (CFU) auf Middlebrook 7H10-Agarplatten ermittelt.

Die *M. bovis* BCG-Impfung induzierte eine positive Immunantwort auf PPD Antigene bei 58,8 % der 17 Individuen im IGRA ($p < 0,001$) im IGRA-ELISpot. Die, durch die *M. bovis* BCG-Impfung induzierte, IGRA-Konversion korrelierte nicht mit der Wachstumskontrolle durch BALC und PBMC ($p = 0,468$). Die BCG-Impfung zeigte keinen Unterschied in der mykobakteriellen Wachstumsgeschwindigkeit vor und nach der Impfung in BALC ($p = 0,604$) und PBMC ($p = 0,199$). Im Vergleich zu BALC konnten PBMC, unabhängig von der Impfung (vor und nach der Impfung $p < 0,001$), das Wachstum der Mykobakterien *in vitro* stärker hemmen.

Vitamin D₃ (1 α , 25 (OH)₂ Cholecalciferol) konnte mykobakterielles Wachstum *in vitro* in BALC ($p < 0,001$) und in PBMC ($p < 0,001$) hemmen. Die *M. bovis* BCG induzierte, mykobakterienspezifische Immunantwort im IGRA führte nicht zu einer funktionellen Wachstumskontrolle von *M. tuberculosis* H37Rv im MGIA. Erst die Anwendung des MGIA mit einem wirksamen Impfstoff gegen Tuberkulose wird zeigen, ob der MGIA ein Surrogatmarker als Korrelat des Immunschutzes vor einer Tuberkuloseinfektion ist.

7 Summary

In order to eliminate tuberculosis (TB), an effective vaccine is urgently needed to prevent infection with *Mycobacterium (M.) tuberculosis*. A key obstacle for the development of a novel TB vaccine is the lack of surrogate markers for immune protection against *M. tuberculosis*.

This thesis describes growth rates of *M. tuberculosis* H37Rv in the mycobacterial growth inhibition assay (MGIA) as a marker for mycobacterial growth control of human bronchoalveolar lavage (BALC) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) before and after vaccination with *M. bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) of healthy adult volunteers. Growth rates after *ex vivo* infection of BALC and PBMC with *M. tuberculosis* H37Rv were measured by mycobacterial growth indicator tube (MGIT) in time to culture positivity (TTP) and colony forming units (CFU) on Middlebrook-7H10-Agarplatten.

M. bovis BCG-vaccination induced a positive response ($p < 0.001$) to PPD antigens in 58.8 % of the 17 individuals in an IGRA-ELISpot. The magnitude of the PPD-response induced by *M. bovis* BCG-vaccination did not correlate with growth control in BALC and PBMC (correlation = 0.468). *M. bovis* BCG-vaccination revealed no significant difference in mycobacterial growth rate before and after vaccination in BALC ($p = 0.604$) and PBMC ($p = 0.199$). PBMC were able to inhibit mycobacterial growth *in vitro* better compared to BALC irrespective of the vaccination (before and after vaccination $p < 0.001$).

Vitamin D₃ (1 α , 25 (OH)₂ cholecalciferol) was able to induce mycobacterial growth inhibition *in vitro* in BALC ($p < 0.001$) and PBMC ($p < 0.001$). The *M. bovis* BCG-vaccination induced mycobacterial-specific immune response did not result in a functional immune control against *M. tuberculosis* in the MGIA. Only the application of MGIA with a protective vaccine against tuberculosis will reveal, if MGIA is a potential new surrogate marker as a correlate of immune protection against tuberculosis infection.

8 Literaturverzeichnis

1. WHO. Fact Sheets Tuberculosis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis> (Zugriff 25.07.2019). 2019.
2. WHO. Global Tuberculosis Report 2018. Geneva: World Health Organization. 2019.
3. Metcalfe JZ, Houben RMGJ, Dodd PJ. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLOS Medicine*. 2016;13(10).
4. Herold G. Innere Medizin. Herold Verlag, Köln, Deutschland. 2018; Auflage 2018 (Kapitel III Pneumologie):412-21.
5. Tille PM. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Elsevier eBook on VitalSource, St Louis, Missouri, USA. 2014; 13th edition (Chapter 43):484-513.
6. WHO. Global Tuberculosis report. Geneva: World Health Organization. 2016.
7. WHO. Global tuberculosis report 2017. Geneva: World Health Organization. 2017; Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
8. Robert-Koch-Institut. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2017 RKI. 2018: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/T/Tuberkulose/Archiv_Berichte_TB_in_Dtl_tab.html (Tag des Zugriffs 31.08.2019).
9. Tortoli E. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(4):727-52.
10. Orgeur M, Brosch R. Evolution of virulence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Curr Opin Microbiol*. 2018;41:68-75.
11. Stout JE, Koh WJ, Yew WW. Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria. *Int J Infect Dis*. 2016;45:123-34.
12. Hof H, Dörries R. Duale Reihe - Medizinische Mikrobiologie Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, Deutschland. 2009; 4. Auflage (Kapitel 2.6.1.):357-65.
13. Bhat ZS, Rather MA, Maqbool M, Lah HU, Yousuf SK, Ahmad Z. Cell wall: A versatile fountain of drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomed Pharmacother*. 2017;95:1520-34.
14. Fine AE, Bolin CA, Gardiner JC, Kaneene JB. A Study of the Persistence of *Mycobacterium bovis* in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA. *Vet Med Int*. 2011;2011(765430):1-12.

15. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*. 2006;6(1):130.
16. Robert-Koch-Institut. Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren. Springer-Verlag GmbH, Deutschland. 2017;60(11):1274-97.
17. Ziehl F. Zur Färbung des Tuberkelbacillus. *Dt Med Wschr*. 1882;8(451).
18. Varughese P, Helbecque DM, McRae KB, Eidus L. Comparison of strip and Ziehl—Neelsen methods for staining acid-fast bacteria. Geneva: World Health Organization. 1974;51(1): 83–91.
19. Robert-Koch-Institut. Tuberkulose RKI-Ratgeber für Ärzte. RKI. 2013:https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tuberkulose.html;jsessionid=CE1C9E724E48685FDFE049DF7391CE4C.1_cid381#doc2374486bodyText5 (Tag des Zugriffs 27.01.2019).
20. Dheda K, Schwander SK, Zhu B, van Zyl-Smit RN, Zhang Y. The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. *Respirology*. 2010;15(3):433-50.
21. Eum SY, Kong JH, Hong MS, Lee YJ, Kim JH, Hwang SH, et al. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest*. 2010;137(1):122-8.
22. Ehlers S, Schaible UE. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host-pathogen collusion. *Front Immunol*. 2012;3:411.
23. Flajnik MF. A cold-blooded view of adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(7):438-53.
24. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, et al. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun*. 1997;65(1):298-304.
25. Jafari C, Olaru ID, Daduna F, Ernst M, Heyckendorf J, Lange C, et al. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by combined molecular and immunological methods. *Eur Respir J*. 2018;51(5).
26. Campbell JR, Krot J, Elwood K, Cook V, Marra F. A systematic review on TST and IGRA tests used for diagnosis of LTBI in immigrants. *Mol Diagn Ther*. 2015;19(1):9-24.
27. Dacso CC. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations: Skin Testing for Tuberculosis. Butterworth Publishers, Oxford, UK. 1990;3rd edition(Chapter 47):<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK369/> (Tag des Zugriffs 27.01.2019).

28. Sester M, van Leth F, Bruchfeld J, Bumbacea D, Cirillo DM, Dilektasli AG, et al. Risk assessment of tuberculosis in immunocompromised patients. A TBNET study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(10):1168-76.
29. Lange C, Mandalakas AM, Kalsdorf B, Denking CM, Sester M. Clinical Application of Interferon-gamma Release Assays for the Prevention of Tuberculosis in Countries with Low Incidence. *Pathog Immun*. 2016;1(2):308-29.
30. Sester M, Sotgiu G, Lange C, Giehl C, Girardi E, Migliori GB, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2011;37(1):100-11.
31. Ulrichs T, Anding P, Porcelli S, Kaufmann SHE, Munk ME. Increased Numbers of ESAT-6 and Purified Protein Derivative-Specific Gamma Interferon-Producing Cells in Subclinical and Active Tuberculosis Infection. *Infect Immun*. 2000;68(10):6073-6.
32. Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT 6 and a novel low-molecular mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology*. 1998;14:3195-203.
33. Oxford-Immunitec-Ltd. Manufacturer's Instructions for T-SPOT.TB 8. Oxfordshire, Great Britain, UK. 2013.
34. QIAGEN-GmbH. QuantiFERON®-TB Gold (QFT®) ELISA Package Insert. Germantown, MD, USA. 2016.
35. Floyd K, Glaziou P, Zumla A, Raviglione M. The global tuberculosis epidemic and progress in care, prevention, and research: an overview in year 3 of the End TB era. *Lancet Respir Med*. 2018;6(4):299-314.
36. Uplekar M, Weil D, Lonnroth K, Jaramillo E, Lienhardt C, Dias HM, et al. WHO's new end TB strategy. *Lancet*. 2015;385(9979):1799-801.
37. Keshavjee S, Farmer PE. Picking up the pace-scale-up of MDR tuberculosis treatment programs. *N Engl J Med*. 2010;363(19):1781-4.
38. Ernst JD. Mechanisms of M. tuberculosis Immune Evasion as Challenges to TB Vaccine Design. *Cell Host Microbe*. 2018;24(1):34-42.
39. Andersen P, Kaufmann SH. Novel vaccination strategies against tuberculosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(6):a018523.
40. Ahsan MJ. Recent advances in the development of vaccines for tuberculosis. *Ther Adv Vaccines*. 2015;3(3):66–75.
41. Zhu B, Dockrell HM, Ottenhoff THM, Evans TG, Zhang Y. Tuberculosis vaccines: Opportunities and challenges. *Respirology*. 2018;23(4):359-68.

42. Kaufmann SH, Lange C, Rao M, Balaji KN, Lotze M, Schito M, et al. Progress in tuberculosis vaccine development and host-directed therapies - a state of the art review. *Lancet Respir Med*. 2014;2(4):301-20.
43. Andersen P, Doherty TM. The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(8):656-62.
44. Fine PEM. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologues immunity. *Lancet*. 1995;346:1339-45.
45. Rodrigues LC, Pereira SM, Cunha SS, Genser B, Ichihara MY, Brito SCd, et al. Effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: the BCG-REVAC cluster-randomised trial. *Lancet*. 2005;366(9493):1290-5.
46. Roy A, Eisenhut M, Harris RJ, Rodrigues LC, Sridhar S, Habermann S, et al. Effect of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection in children: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2014;349:g4643.
47. Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, Beynon R, Pimpin L, Fine PE, et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis*. 2014;58(4):470-80.
48. Colditz GA. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA*. 1994;271(9):698-702.
49. Horwitz O, Meyer J. The Safety Record Of BCG Vaccination And Untoward Reactions Observed After Vaccination. *Adv Tuberc Res*. 1957;8:245-71.
50. Lotte A, Wasz-Höckert O, Poisson N, Dumitrescu N, Verron M, Couvet E. BCG Complications. Estimates of the Risks among Vaccinated Subjects and Statistical Analysis of Their Main Characteristics. *Adv Tuberc Res*. 1984;21:107-93.
51. Jeena PM, Chhagan MK, Topley J, Coovadia HM. Safety of the intradermal Copenhagen 1331 BCG vaccine in neonates in Durban, South Africa. *Bull World Health Organ*. 2001;79(4):337-43.
52. Ustvedt HJ. Local Reaction In BCG Vaccination. *Bull World Health Organ*. 1950;27(2):441-68.
53. Casanova JL, Blanche S, Emile JF, Jouanguy E, Lamhamedi S, Altare F, et al. Idiopathic disseminated bacillus Calmette-Guérin infection: a French national retrospective study. *Pediatrics*. 1996;98(4.1):774-8.
54. Robert-Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin: BCGitis nach Immuntherapie eines Blasenkarzinoms. *RKI*. 2006;18:137-46.

55. Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, Shariat SF, van Rhijn BW, Comperat E, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol.* 2013;64(4):639-53.
56. Attou R, Albrich T, Kadou J, Redant S, Honore PM, De Bels D. Favorable Outcome in a Patient with Systemic BCGitis After Intra-bladder Instillation of Calmette-Guerin Bacillus Highlighting the Importance of Making the Correct Diagnosis in this Rare Form of Sepsis. *J Transl Int Med.* 2019;7(1):34-8.
57. Scriba TJ, Kaufmann SH, Henri Lambert P, Sanicas M, Martin C, Neyrolles O. Vaccination Against Tuberculosis With Whole-Cell Mycobacterial Vaccines. *J Infect Dis.* 2016;214(5):659-64.
58. Huang CY, Hsieh WY. Efficacy of *Mycobacterium vaccae* immunotherapy for patients with tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13(9):1960-71.
59. Loxton AG, Knaul JK, Grode L, Gutschmidt A, Meller C, Eisele B, et al. Safety and Immunogenicity of the Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine VPM1002 in HIV-Unexposed Newborn Infants in South Africa. *Clin Vaccine Immunol.* 2017;24(2):e00439-16.
60. Gillard P, Yang PC, Danilovits M, Su WJ, Cheng SL, Pehme L, et al. Safety and immunogenicity of the M72/AS01E candidate tuberculosis vaccine in adults with tuberculosis: A phase II randomised study. *Tuberculosis (Edinb).* 2016;100:118-27.
61. Van Der Meeren O, Hatherill M, Nduba V, Wilkinson RJ, Muyoyeta M, Van Brakel E, et al. Phase 2b Controlled Trial of M72/AS01E Vaccine to Prevent Tuberculosis. *N Engl J Med.* 2018;379(17):1621-34.
62. Tait DR, Hatherill M, Van Der Meeren O, Ginsberg AM, Van Brakel E, Salaun B, et al. Final Analysis of a Trial of M72/AS01E Vaccine to Prevent Tuberculosis. *N Engl J Med.* 2019;381(25):2429-39.
63. Tameris MD, Hatherill M, Landry BS, Scriba TJ, Snowden MA, Lockhart S, et al. Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet.* 2013;381(9871):1021-8.
64. Stylianou E, Harrington-Kandt R, Beglov J, Bull N, Pinpathomrat N, Swarbrick GM, et al. Identification and Evaluation of Novel Protective Antigens for the Development of a Candidate Tuberculosis Subunit Vaccine. *Infect Immun.* 2018;86(7):e00014-18.
65. WHO. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe. Geneva: World Health Organization. 2017.
66. Loddenkemper R, Diel R, Schaberg T. [Tuberculosis - historical development, current status, future prospects]. *Pneumologie.* 2010;64(9):567-72.

67. Nemes E, Geldenhuys H, Rozot V, Rutkowski KT, Ratangee F, Bilek N, et al. Prevention of *M. tuberculosis* Infection with H4:IC31 Vaccine or BCG Revaccination. *N Engl J Med*. 2018;379(2):138-49.
68. Kaufmann SH. Fact and fiction in tuberculosis vaccine research: 10 years later. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(8):633-40.
69. Hanekom WA, Dockrell HM, Ottenhoff TH, Doherty TM, Fletcher H, McShane H, et al. Immunological outcomes of new tuberculosis vaccine trials: WHO panel recommendations. *PLoS Med*. 2008;5(7):e145.
70. Hoft D, Worku S, Kampmann B, Whalen C, Ellner J, Hirsch C, et al. Investigation of the relationships between immune-mediated inhibition of mycobacterial growth and other potential surrogate markers of protective *Mycobacterium tuberculosis* immunity. *J Infect Dis*. 2002;186(10):1448-57.
71. Brennan MJ, Tanner R, Morris S, Scriba TJ, Achkar JM, Zelmer A, et al. The Cross-Species Mycobacterial Growth Inhibition Assay (MGIA) Project, 2010-2014. *Clin Vaccine Immunol*. 2017;24(9):e00142-17.
72. Tanner R, O'Shea MK, Fletcher HA, McShane H. In vitro mycobacterial growth inhibition assays: A tool for the assessment of protective immunity and evaluation of tuberculosis vaccine efficacy. *Vaccine*. 2016;34(39):4656-65.
73. Fletcher HA, Tanner R, Wallis RS, Meyer J, Manjaly ZR, Harris S, et al. Inhibition of Mycobacterial Growth In Vitro following Primary but Not Secondary Vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20(11):1683-9.
74. Harris SA, Meyer J, Satti I, Marsay L, Poulton ID, Tanner R, et al. Evaluation of a human BCG challenge model to assess antimycobacterial immunity induced by BCG and a candidate tuberculosis vaccine, MVA85A, alone and in combination. *J Infect Dis*. 2014;209(8):1259-68.
75. Jensen C, Holm LL, Svensson E, Aagaard C, Ruhwald M. Optimisation of a murine splenocyte mycobacterial growth inhibition assay using virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*. 2017;7(1):2830-41.
76. Zelmer A, Tanner R, Stylianou E, Damelang T, Morris S, Izzo A, et al. A new tool for tuberculosis vaccine screening: Ex vivo Mycobacterial Growth Inhibition Assay indicates BCG-mediated protection in a murine model of tuberculosis. *BMC Infectious Diseases*. 2016;16(412):1-9.
77. Marsay L, Matsumiya M, Tanner R, Poyntz H, Griffiths KL, Stylianou E, et al. Mycobacterial growth inhibition in murine splenocytes as a surrogate for protection against *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*). *Tuberculosis (Edinb)*. 2013;93(5):551-7.

78. Parra M, Yang AL, Lim J, Kolibab K, Derrick S, Cadieux N, et al. Development of a murine mycobacterial growth inhibition assay for evaluating vaccines against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16(7):1025-32.
79. Tanner R, O'Shea MK, White AD, Muller J, Harrington-Kandt R, Matsumiya M, et al. The influence of haemoglobin and iron on in vitro mycobacterial growth inhibition assays. *Sci Rep*. 2017;7:43478.
80. Smith SG, Zelmer A, Blitz R, Fletcher HA, Dockrell HM. Polyfunctional CD4 T-cells correlate with in vitro mycobacterial growth inhibition following *Mycobacterium bovis* BCG-vaccination of infants. *Vaccine*. 2016;34(44):5298-305.
81. Joosten SA, van Meijgaarden KE, Arend SM, Prins C, Oftung F, Korsvold GE, et al. Mycobacterial growth inhibition is associated with trained innate immunity. *J Clin Invest*. 2018;128(5):1837-51.
82. Riches DWH, Martin TR. Overview of Innate Lung Immunity and Inflammation. *Methods Mol Biol*. 2018;1809:17-30.
83. Fujita Y, Kadota T, Araya J, Ochiya T, Kuwano K. Extracellular Vesicles: New Players in Lung Immunity. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018;58(5):560-5.
84. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 2013;38(1):79-91.
85. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. 2013;38(4):792-804.
86. Liegeois M, Legrand C, Desmet CJ, Marichal T, Bureau F. The interstitial macrophage: A long-neglected piece in the puzzle of lung immunity. *Cell Immunol*. 2018;330:91-6.
87. Iwasaki A, Foxman EF, Molony RD. Early local immune defences in the respiratory tract. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(1):7-20.
88. Radicioni G, Cao R, Carpenter J, Ford AA, Wang T, Li L, et al. The innate immune properties of airway mucosal surfaces are regulated by dynamic interactions between mucins and interacting proteins: the mucin interactome. *Mucosal Immunol*. 2016;9(6):1442-54.
89. White D, Sibley L, Dennis MJ, Gooch K, Betts G, Edwards N, et al. Evaluation of the Safety and Immunogenicity of a Candidate Tuberculosis Vaccine, MVA85A, Delivered by Aerosol to the Lungs of Macaques. *CVI*. 2013;20(5):663-73.
90. McShane H. University of Oxford, MVA85A Aerosol vs Intramuscular Vaccination in Adults With Latent *Mycobacterium Tuberculosis* (M. tb) Infection. *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02532036*. 2018.

91. Haussinger K, Ballin A, Becker HD, Bolcskei P, Dierkesmann R, Dittrich I, et al. Recommendations for quality standards in bronchoscopy. *Pneumologie*. 2004;58(5):344-56.
92. Brakke MK. Density gradient centrifugation: A new separation technique. *J Am Chem Soc*. 1951;73:1847-8.
93. Brakke MK. Zonal separations by density-gradient centrifugation. *Arch Biochem Biophys*. 1953;45(2):275–90.
94. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:77-89.
95. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2001;A.3B.1(appendix 3B):Supplement 21.
96. Thermo Electron Corporation Shandon Cytospin 4. Operator Guide, Runcorn, UK. 2004;A78310250(4):1-120.
97. Pappenheim A. Technik der klinischen Blutuntersuchung für Studierende und Ärzte. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, Deutschland. 1911.
98. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393:537-44.
99. Lorian V. Comparison of *Mycobacterial* Cultures on Agar and Lowenstein Medium. *App Microbiol*. 1967;15(5):1202-5.
100. Chambers JM, Cleveland WS, Kleiner B, Tukey PA. Graphical methods for data analysis. Bell Telephone Laboratories Inc Murray Hill, New Jersey, USA. 1983;2nd edition(Chapter 3.4):60-3.
101. R.. Regulatory Compliance and Validation Issues: A guidance document for the use of R in regulated clinical trial environments. 2019:<https://www.r-project.org/> (Zugriff 06.2.2019).
102. Janeway C, Travers P, Walport M. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. Garland Science, New York, USA. 2001;5th edition(Chapter 1):<https://livresbioapp.files.wordpress.com/2015/07/janeway-c-travers-p-walport-m-shlomchik-m-immunobiology-01.pdf> (Zugriff 27.01.9).
103. Costabel U, Donner CF, Haslam PL, Rizzato G, Teschler H, Velluti G, et al. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): occupational lung diseases due to inhalation of inorganic dust. *Eur Respir J*. 1990;3(8):946-9, 61-9.

104. McDonough KA, Kress Y, Bloom BR. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect Immun*. 1993;61(7):2763-73.
105. Wu Q, Hossfeld A, Gerberick A, Saljoughian N, Tiwari C, Mehra S, et al. *Mycobacterium tuberculosis* enhances macrophage P-glycoprotein (MDR1) expression and activity to promote intracellular survival during anti-TB drug treatment. *J Infect Dis*. 2019.
106. Suter E. The multiplication of tubercle bacilli within normal phagocytes in tissue culture. *J Exp Med*. 1952;96(2):137-50.
107. Hirsch CS, Ellner JJ, Russell DG, Rich EA. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor- α -mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J Immunol* 1994;152:743-53.
108. Zwerling A, Behr M, Verma A, Brewer T, Menzies D. The BCG World Atlas: A Database of Global BCG Vaccination Policies and Practices. *PLoS Med*. 2011;8(3):e1001012.
109. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Hesselning AC, Obihara CC, Nelson LJ, et al. The clinical epidemiology of childhood pulmonary tuberculosis: a critical review of literature from the pre-chemotherapy era. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004;8(3):278-85.
110. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Hesselning AC, Obihara CC, Starke JJ, et al. The natural history of childhood intra-thoracic tuberculosis: a critical review of literature from the pre-chemotherapy era. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004;8(4):392-402.
111. Newton SM, Brent AJ, Anderson S, Whittaker E, Kampmann B. Paediatric tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2008;8(8):498-510.
112. Bjorn-Mortensen K, Soborg B, Koch A, Ladefoged K, Merker M, Lillebaek T, et al. Tracing *Mycobacterium tuberculosis* transmission by whole genome sequencing in a high incidence setting: a retrospective population-based study in East Greenland. *Sci Rep*. 2016;6:33180.
113. Cheon SH, Kampmann B, Hise AG, Phillips M, Song HY, Landen K, et al. Bactericidal activity in whole blood as a potential surrogate marker of immunity after vaccination against tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(4):901-7.
114. Kampmann B, Gaora PO, Snewin VA, Gares MP, Young DB, Levin M. Evaluation of human antimycobacterial immunity using recombinant reporter mycobacteria. *J Infect Dis*. 2000;182(3):895-901.
115. Cheng SH, Walker L, Poole J, Aber VR, Walker KB, Mitchison DA, et al. Demonstration of increased anti-mycobacterial activity in peripheral blood monocytes after BCG vaccination in British school children. *Clin Exp Immunol*. 1988;74(1):20-5.
116. Tena GN, Young DB, Eley B, Henderson H, Nicol MP, Levin M, et al. Failure to control growth of mycobacteria in blood from children infected with human

- immunodeficiency virus and its relationship to T cell function. *J Infect Dis.* 2003;187(10):1544-51.
117. Leopold Wager CM, Arnett E, Schlesinger LS. Mycobacterium tuberculosis and macrophage nuclear receptors: What we do and don't know. *Tuberculosis (Edinb).* 2019;116S:S98-S106.
 118. Bryson BD, Rosebrock TR, Tafesse FG, Itoh CY, Nibasumba A, Babunovic GH, et al. Heterogeneous GM-CSF signaling in macrophages is associated with control of Mycobacterium tuberculosis. *Nat Commun.* 2019;10(1):2329.
 119. Moliva JJ, Duncan MA, Olmo-Fontanez A, Akhter A, Arnett E, Scordo JM, et al. The lung mucosa environment in the elderly increases host susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Infect Dis.* 2019.
 120. Scordo JM, Olmo-Fontanez AM, Kelley HV, Sidiki S, Arcos J, Akhter A, et al. The human lung mucosa drives differential Mycobacterium tuberculosis infection outcome in the alveolar epithelium. *Mucosal Immunol.* 2019;12(3):795-804.
 121. Latorre I, Fernandez-Sanmartin MA, Muriel-Moreno B, Villar-Hernandez R, Vila S, Souza-Galvao ML, et al. Study of CD27 and CCR4 Markers on Specific CD4(+) T-Cells as Immune Tools for Active and Latent Tuberculosis Management. *Front Immunol.* 2018;9:3094.
 122. Ruhwald M, de Thurah L, Kuchaka D, Zaher MR, Salman AM, Abdel-Ghaffar AR, et al. Introducing the ESAT-6 free IGRA, a companion diagnostic for TB vaccines based on ESAT-6. *Sci Rep.* 2017;7:45969.
 123. Evans TG, Churchyard GJ, Penn-Nicholson A, Chen C, Gao X, Tait DR, et al. Epidemiologic studies and novel clinical research approaches that impact TB vaccine development. *Tuberculosis (Edinb).* 2016;99 Suppl 1:S21-5.
 124. Ginsberg AM. Designing tuberculosis vaccine efficacy trials - lessons from recent studies. *Expert Rev Vaccines.* 2019;18(5):423-32.
 125. Sharma SK, Vashishtha R, Chauhan LS, Sreenivas V, Seth D. Comparison of TST and IGRA in Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in a High TB-Burden Setting. *PLoS One.* 2017;12(1):e0169539.
 126. Sali M, Buonsenso D, D'Alfonso P, De Maio F, Ceccarelli M, Battah B, et al. Combined use of Quantiferon and HBHA-based IGRA supports tuberculosis diagnosis and therapy management in children. *J Infect.* 2018;77(6):526-33.
 127. Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J.* 2011;37(1):88-99.

128. Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part I. Latent tuberculosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006;6(3):413-22.
129. Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, Gottschalk R, Nienhaus A. Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest.* 2009;135(4):1010-8.
130. Zellweger JP, Sotgiu G, Block M, Dore S, Altet N, Blunschi R, et al. Risk Assessment of Tuberculosis in Contacts by IFN-gamma Release Assays. A Tuberculosis Network European Trials Group Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191(10):1176-84.
131. Winje BA, White R, Syre H, Skutlaberg DH, Oftung F, Mengshoel AT, et al. Stratification by interferon-gamma release assay level predicts risk of incident TB. *Thorax.* 2018.
132. Jafari C, Ernst M, Kalsdorf B, Greinert U, Diel R, Kirsten D, et al. Rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis by bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(9):1048-54.
133. Silver RF, Zukowski L, Kotake S, Li Q, Pozuelo F, Krywiak A, et al. Recruitment of antigen-specific Th1-like responses to the human lung following bronchoscopic segmental challenge with purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29(1):117-23.
134. Fabri M, Stenger S, Shin DM, Yuk JM, Liu PT, Realegeno S, et al. Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci Transl Med.* 2011;3(104):104ra2.
135. Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL, Greenberg L, Aloia JF, Bergman P, et al. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ.* 2017;356:i6583.
136. Coussens A, Timms PM, Boucher BJ, Venton TR, Ashcroft AT, Skolimowska KH, et al. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits matrix metalloproteinases induced by *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology.* 2009;127(4):539-48.
137. Ganmaa D, Munkhzul B, Fawzi W, Spiegelman D, Willett WC, Bayasgalan P, et al. High-Dose Vitamin D₃ during Tuberculosis Treatment in Mongolia. A Randomized Controlled Trial. *AJRCCM.* 2017;196(5):628–37.
138. Liu PT, Stenger S, Tang DH, Modlin RL. Cutting Edge: Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Activity against *Mycobacterium Tuberculosis* Is Dependent on the Induction of Cathelicidin. *J Immun.* 2007;179(4):2060-3.
139. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science.* 2006;311(5768):1770-3.

140. Martineau AR, Wilkinson KA, Newton SM, Floto RA, Norman AW, Skolimowska K, et al. IFN-gamma- and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. *J Immunol.* 2007;178(11):7190-8.
141. Rockett KA, Brookes R, Udalova I, Vidal V, Hill AV, Kwiatkowski D. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a human macrophage-like cell line. *Infect Immun.* 1998;66(11):5314-21.
142. Crowle AJ, Ross EJ, May MH. Inhibition by 1,25(OH)₂-vitamin D3 of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. *Infect Immun.* 1987;55(12):2945-50.
143. Rocchietta S. Aerosol vaccination with BCG. *Minerva Med.* 1952;43(41):1067.
144. McShane H. University of Oxford, Investigating immune responses to aerosol BCG challenge in healthy UK adults. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03912207. 2019.
145. Sumner T, Scriba TJ, Penn-Nicholson A, Hatherill M, White RG. Potential population level impact on tuberculosis incidence of using an mRNA expression signature correlate-of-risk test to target tuberculosis preventive therapy. *Sci Rep.* 2019;9(1):11126.
146. Beery AK, Zucker I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011;35(3):565-72.
147. Wald C, Wu C. Biomedical research. Of mice and women: the bias in animal models. *Science.* 2010;327(5973):1571-2.
148. Stead WW, Senner JW, Reddick WT, Lofgren JP. Racial Differences in Susceptibility to Infection by *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med.* 1990;322:422-7.
149. Valeri CR, Pivacek LE. Effects of the temperature, the duration of frozen storage, and the freezing container on in vitro measurements in human peripheral blood mononuclear cells. *Transfusion.* 1996;36(4):303-8.
150. Shu Z, Weigel KM, Soelberg SD, Lakey A, Cangelosi GA, Lee KH, et al. Cryopreservation of *Mycobacterium tuberculosis* complex cells. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3575-80.
151. Yang AL, Schmidt TE, Stibitz S, Derrick SC, Morris SL, Parra M. A simplified mycobacterial growth inhibition assay (MGIA) using direct infection of mouse splenocytes and the MGIT system. *J Microbiol Methods.* 2016;131:7-9.
152. Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutierrez J, et al. Comparison of the mycobacteria growth indicator tube (MGIT) with radio- metric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *Clin Microbiol.* 1997; 35:364–8.

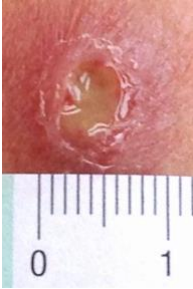
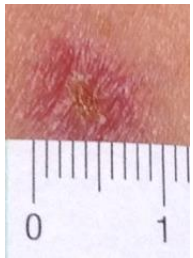
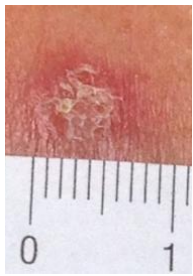
153. Srivastava S, Ernst JD, Desvignes L. Beyond macrophages: the diversity of mononuclear cells in tuberculosis. *Immunol Rev.* 2014;262(1):179-92.
154. Zhang Y. Persisters, persistent infections and the Yin-Yang model. *Emerg Microbes Infect.* 2014;3(1):e3.
155. Bowness R, Boeree MJ, Aarnoutse R, Dawson R, Diacon A, Mangu C, et al. The relationship between *Mycobacterium tuberculosis* MGIT time to positivity and cfu in sputum samples demonstrates changing bacterial phenotypes potentially reflecting the impact of chemotherapy on critical sub-populations. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(2):448-55.
156. Kayigire XA, Friedrich SO, van der Merwe L, Donald PR, Diacon AH. Simultaneous staining of sputum smears for acid-fast and lipid-containing *Myobacterium tuberculosis* can enhance the clinical evaluation of antituberculosis treatments. *Tuberculosis (Edinb).* 2015;95(6):770-9.
157. Peddireddy V, Doddam SN, Ahmed N. *Mycobacterial Dormancy Systems and Host Responses in Tuberculosis.* *Front Immunol.* 2017;8(84).
158. Horsburgh CR, Barry CE, Lange C. Treatment of Tuberculosis. *N Engl J Med.* 2015;373(22):2149-60.
159. Perdomo C, Zedler U, Kuhl AA, Lozza L, Saikali P, Sander LE, et al. Mucosal BCG Vaccination Induces Protective Lung-Resident Memory T Cell Populations against Tuberculosis. *MBio.* 2016;7(6):e01686-16.
160. Aguilo N, Alvarez-Arguedas S, Uranga S, Marinova D, Monzon M, Badiola J, et al. Pulmonary but Not Subcutaneous Delivery of BCG Vaccine Confers Protection to Tuberculosis-Susceptible Mice by an Interleukin 17-Dependent Mechanism. *J Infect Dis.* 2016;213(5):831-9.
161. Rook GAW, Steele J, Fraher L, Barker S, Karmali R, O'Riordan J, et al. Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of *Mycobacterium tuberculosis* by human monocytes. *Immunology.* 1986;57:159-63.
162. Afsal K, Selvaraj P, Harishankar M. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 downregulates cytotoxic effector response in pulmonary tuberculosis. *Int Immunopharmacol.* 2018;62:251-60.
163. Ferrari D, Lombardi G, Banfi G. Concerning the vitamin D reference range: pre-analytical and analytical variability of vitamin D measurement. *Biochem Med (Zagreb).* 2017;27(3):030501.
164. Parapoulos SE, Fahrer LJ, Clemens TL, Gleed J, O'Riordan JLH. Metabolites of Vitamin D in human Deficiency: Effekt of vitamin D3 or 1,25 Dihydroxycholecalciferol. *Lancet.* 1980;75(1):612-5.

9 Anhang

9.1 BCG-Impfulzerationen im zeitlichen Verlauf

Bei allen Probanden blieb die Ulzeration mit weniger als elf mm Durchmesser in dem physiologisch zu erwartendem Ausmaß. Die hier gezeigte Probandin entwickelte am rechten Oberarm das am deutlichsten ausgeprägte Ulkus und stellte die Aufnahmen zur Verfügung. Bei allen weiteren Teilnehmern waren die Reaktionen deutlich schwächer und bei zwei Probanden konnte nach dem Verschwinden der intradermalen Quaddel gar keine weitere Hautreaktion beobachtet werden.

Datum	Beschreibung	BCG-Impfulzeration
01.09.2015	Intradermale Quaddel am Tag der <i>M. bovis</i> BCG-Impfung	
03.09.2015	Drei Tage nach der Impfung	
09.09.2015	Acht Tage nach der Impfung	

24.09.2015	23 Tage nach der Impfung, Maximalform des Ulkus. Mit weniger als elf mm Durchmesser gehört dieses Bild zu den zu erwartenden Nebenwirkungen der <i>M. bovis</i> BCG-Impfung.	
02.10.2015	Etwa einen Monat nach der Impfung ist eine Crusta sichtbar.	
13.10.2015	Sechs Wochen nach der Impfung	
23.10.2015	Etwa siebeneinhalb Wochen nach der Impfung.	
05.11.2015	Etwas mehr als zwei Monate nach der Impfung.	
01.02.2015	Fünf Monate nach der Impfung bildet sich die geschlossene Impfnarbe aus.	

9.2 Reagenzien, Lösungen und Medien

9.2.1 IGRA ELISpot

	Inhalt	Firma	Ort	Lot No
ELISpot TestKit TB-SPOT®.TB	Mikrotiterplatte mit INF- γ Antikörpern, ESAT-6, CFP-10, Phythämagglutinin, 200-fach konzentriertes Konjugat, Substrat BCIP/NBTplus-Lösung	Oxford Immunotec Ltd.	Oxfordshire, Großbritan- nien	TEC126372
RPMI mit HEPES RPMI 1640 Medium (1x) mod.	w stabiles Glutamin w Phenolrot w 20 mM HEPES w/o NaHCO ₃	Biochrom AG	Berlin, Deutschland	1075 B
Penicillin- Streptomycin	10.000 U/mL Penicillin 10.000 μ g/mL Streptomycin	Biochrom AG	Berlin, Deutschland	0265C
FCS (fetal calf serum) fetales Kälberserum Standard	fetales Kälberserum, chargengleich verwendet	PAA Labor- atories GmbH	Pasching, Österreich	A 10 110- 1631
Anti-CD3 monoklonaler Antikörper	PN IM0178-purified-Freeze- dried-0,2mg-Clone X35	Beckmann Coulter Inc.	Brea, Kalifornien USA	1594083
PPD purified protein derivate für <i>in vitro</i> Nutzung	standardisiertes Antigengemisch mit 1 mg/mL in physiologischem PBS gelöst	Statens Serum Institute	Kopenhagen Dänemark	2390

9.2.2 Zellaufbereitung

	Inhalt	Firma	Ort	Lot No
Midazolam	5 mg/5 mL	Ratiopharm GmbH	Ulm, Deutschland	
Propofol	Einprozentiges Propofol	Fresenius SE & Co KGaA	Bad Homburg, Deutschland	
Scandicain	Zweiprozentiges Scandicain	Astra Zeneca PLC	London, Großbritannien	
PBS - Phosphate Buffered Saline Solution Phosphat gepufferte Salzlösung	w 8 g/L NaCl	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland	K43390104 218
	w 0,2 g/L KCl			K38595136 825
	w 0,2 g/L KH_2PO_4			K24331873 847
	w 1,44 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$			6346.0500 038 A500946
HBSS HANK's Balanced Salt Solution - Salzlösung	w/o Phenolrot w/o Calcium w/o Magnesium w 350 mg/L NaHCO_3	PAN Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland	5980314
Bicoll Separating Solution isotonische Lösung	Dichte 1,077 g/mL, steril gefiltert	Biotech GmbH	Berlin, Deutschland	0309 C L6115
RPMI-Phenolrot-Medium RPMI 1640 flüssig mit L-Glutamin REF: 21875-034	w L-Glutamin w Phenolrot	Gibco® Life Technologies™ AG	Carlsbad, Kalifornien, USA	1594083
Amphotericin B	250 µg/mL	Biochrom AG	Berlin, Deutschland	1410 B
Penicillin G	1658 IU/mg	Biochrom AG	Berlin, Deutschland	NAE 201002-2

Humanserum, männlich	AB Plasma	Sigma- Aldrich Corp.	St.Louis, USA	117K1693
Trypan Blue Solution 0,4 %	0,81 % NaCl 0,06 % K ₃ PO ₄	Sigma- Aldrich Corp.	St.Louis, USA	029K2358
Fixierlösung Lösung 1,2 und 3 Haemacolor® Schnellfärbung von Blutausstrichen	Methanol, Eosin G und Azur Blau	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland	HX416759 55
Puffertabletten pH 7,2 Pufferlösung nach WEISE	Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O KH ₂ PO ₄	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland	TP1013568 004

9.2.3 MGIA und Nährmedien

	Inhalt	Firma	Ort	Lot No
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv Stamm Nummer ATCC 27294	Titer $5,8 \cdot 10^7$ CFU/mL Anzucht in 7H9/OADC + 0,05 % Tyloxapol	Nationales Referenz- zentrum für Mykobak- teriologie	Borstel, Deutschland	(NRZ 9679/00)
<i>Mycobacterium bovis</i> Danish 1331	0,75 mg <i>Mycobacterium bovis</i> , Danish 1331 zur Rekonstitution mit 1 mL mitgeliefertem Solvens	Statens Serum Institut	Kopenhagen Dänemark	113008D
RPMI-Phenolrot-Medium RPMI 1640 flüssig mit L-Glutamin REF: 21875-034	w L-Glutamin w Phenolrot	Gibco® Life Techno- logies™ AG	Carlsbad, Kalifornien, USA	1594083
Humanserum, männlich	AB plasma	Sigma- Aldrich Corp.	St.Louis, USA	117K1693
Amphotericin B	250 µg/mL	Biochrom AG	Berlin, Deutschland	1410 B
Einprozentiges Penicillin G	1658 IU/mg	Biochrom AG	Berlin, Deutschland	NAE 201002-2
Vitamin D₃ Calcitriol	1α, 25 (OH) ₂ Cholecalciferol	Biomol GmbH	Hamburg, Deutschland	
DMSO	Dimethylsulfoxid	Wald- Apotheke	Wahlstedt, Deutschland	2912E- 01336
Spezielle Zugaben zur Flüssigkultur im MGIT Röhrchen				
MGIT Röhrchen BD BBL™ MGIT™ Indikatorröhrchen für Mykobakterien- wachstum 4mL	110 µL Fluoreszenzindikator 4 mL modifizierte 7H9 Bouillonbasis 5,9 g/L Caseinpepton 1,25 g/L	Becton, Dickinson and Company Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA	
PANTA BD BBL™ MGIT™ PANTA™ 245114	6000 units Polymyxin B 600 µg Amphotericin B 2400 µg Nalidixic acid 600 µg Trimethoprim 600 µg Azlocillin	Becton, Dickinson and Company Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA	

OADC-Medium BD BBL™ MGIT™ OADC 245116	Rinderalbumin 50 g/L Dextrose 20 g/L Katalase 0,03 g/L Ölsäure 0,6 g/L	Becton, Dickinson and Company Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA	
Spezielle Zugaben zur Festkultur auf Agarplatten				
7H10 Middlebrook Agar Difco™ Middlebrook 7H10 Agar Ref: 262710	Agar Trockenpulver	Becton, Dickinson and Company Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA	1335203
Glycerol Glycerin 87 %	Glycerol reinst	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland	K26023379 1 901
Rinderserum Rinderserum French Origin	steril filtriert	Biowest S.A.S	Nuaillé, Frankreich	S09551S02 50
Petrischalen quadratisch mit Gitternetz	100 mm*100 mm*15 mm, volume 110 mL	Simport	Beloeil, Kanada	B01547521

9.3 Kritische Einordnung der Methoden

9.3.1 Studiendesign

Die Studienteilnehmer waren zu 53 % weiblich, womit ein nahezu ausgeglichenes Geschlechterverhältnis in der Studienpopulation erreicht werden konnte (146, 147). Die Versuchspersonen waren ausschließlich europäischer Ethnie, entsprachen also einer einheitlichen Kohorte, die allerdings nicht repräsentativ für die Gesamtheit der mit Tuberkulose infizierten Menschen war (148).

Die Versuchspersonen wurden acht bis zehn Wochen nach der *M. bovis* BCG-Impfung zum zweiten Mal bronchoskopiert, womit genügend Zeit zur Ausbildung einer Immunantwort gegeben war (102).

Um eine Verstärkung der zellulären Immunkontrolle nachzuweisen, war als infizierender Laborstamm anstelle von *M. tuberculosis* H37Rv auch ein *M. bovis* BCG-Stamm zu erwägen. In der Literatur wird für den Infektionsassay auch die Verwendung schnellwachsender Mykobakterien wie *M. smegmatis* (76) oder auch *M. tuberculosis* Erdmann (75) beschrieben. Die *in vitro* Infektion mit *M. bovis* BCG hätte zwar nicht die zelluläre Wachstumskontrolle von pathogenen Mykobakterien gezeigt, aber möglicherweise die interne Validität des Tests erhöht. Ein ausreichend konstantes Wachstum eines z. B. impfchargengleichen *M. bovis* BCG-Stammes war bei verringerter Infektiosität im Vergleich zu *M. tuberculosis* nicht zu erwarten. Um die Infektionssituation *in vivo* möglichst realistisch abzubilden, wurde *M. tuberculosis* H37Rv als infizierender Laborstamm ausgewählt.

9.3.2 Test Qualität

Sämtliche Untersuchungen wurden mit der gleichen Charge *M. tuberculosis* H37Rv durchgeführt, jedoch an unterschiedlichen Tagen. Vorteilhaft dabei war, dass die PBMC so nicht kryokonserviert werden mussten, da es beim Einfrieren der Zellen auch unter optimalen Bedingungen zu einem Vitalitätsverlust von bis zu zehn Prozent der Zellen kommt (149). Dennoch musste der Effekt berücksichtigt werden, dass aliquotierte und kryokonservierte Mykobakterien mit zunehmender Lagerungszeit vermehrt absterben und die anschließend messbare Wachstumsrate der Mykobakterien sukzessive absinkt (150). Es wurde diesem Effekt mit regelmäßiger Bestimmung der CFU-Menge ohne Zellen

(Inokulum) bei jedem Versuchsansatz Rechnung getragen. Der Effekt des Inokulum korrelierte mit den Messwerten an Tag Vier in MGIT in TTP (Std.), wie in Abbildung 11 dargestellt. Ein generell schnelleres Wachstum der Mykobakterien im Inokulum führte also auch zu einem schnelleren Wachstum in der TTP in MGIT an Tag Vier im Zellansatz. Eine Einberechnung dieses Effektes veränderte die weiteren statistischen Ergebnisse aber nicht signifikant, so dass in den weiteren statistischen Analysen eine mathematische Anpassung dieses Effektes bei den TTP-Werten zugunsten der Darstellung von primären Messdaten verzichtet wurde.

Die Ergebnisse der Qualitätsuntersuchungen zeigen ein deutlich geringeres Konfidenzintervall für die Streuung der Messwerte um den Median der Ergebnisse der TTP-Messungen. Im Vergleich dazu lag die Streuung der ausgezählten Kolonien in einem weiteren Bereich, was die CFU-Bestimmung als eine unpräzisere Messmethode des mykobakteriellen Wachstums bestätigt (151, 152). Zeitgleich bleibt in der Literatur die Auszählung der CFU der Goldstandard, auch weil dies, ohne eine weitere Kontrollmethode, direkt die kulturmorphologische Differenzierung der Kolonien erlaubt.

Diese divergenten Ergebnisse zwischen TTP in MGIT und CFU auf Festagar zeigen auch, dass die durchaus gängige Umrechnung der Zeit zur Kulturpositivität in eine theoretischen CFU-Wert (73) kritisch betrachtet werden sollte.

9.3.3 Einschränkungen des MGIA

Bei der Verwendung der Zellen muss berücksichtigt werden, dass PBMC und BALC aufgrund des verschiedenen Ausgangsmaterials (Blut und Lavage) nicht identisch aufgereinigt werden konnten. In dem anschließend präparierten BALC-Isolat waren zwar absolut gesehen gleich viele Zellen wie im PBMC-Isolat enthalten, allerdings befinden sich in der Lavage lungengesunder Personen mehr als 90 % Makrophagen, wobei in PBMC durch den hohen Lymphozytenanteil der Anteil der Monozyten mit 10 bis 30 % viel geringer ist (153). Des Weiteren sind nicht ausschließlich Alveolarmakrophagen in bronchoalveolärer Lavage vertreten, auch Monozyten oder interstitielle Makrophagen befinden sich zum Teil luminal und somit auch in dem aufgereinigten Zellisolat (86). Das Verhältnis von Lavagelymphozyten und Lavagemonozyten/ -makrophagen mit 1:10 nahezu umgekehrt zu dem Verhältnis Blutlymphozyten und Blutmonozyten mit 9:10.

Durch dieses ungleiche Verteilungsverhältnis ist ein unterschiedliches mykobakterielles Wachstumsverhalten zu erwarten, da *M. tuberculosis* sich intrazellulär im Makrophagen repliziert. Die Wachstumsgeschwindigkeit müsste folglich in der bronchoalveolären Lavage aufgrund des höheren Makrophagenanteils generell höher liegen. Ein Infektionsassay mit 50 % PBMC und 50 % BALC als stimulierende Zellen könnte den Lymphozyteneinfluss in Kompartiment Lunge simulieren, da sich Lymphozyten nicht in der Lavage finden und dennoch im Kompartiment Lunge an der Abwehrsituation beteiligt sind.

9.3.4 Die Multiplizität der Infektion

Die Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection; MOI) beschreibt das Verhältnis der Bakterienanzahl pro Zellzahl. Bei einer MOI von eins werden in der Kultur gleich viele Bakterien wie Zellen eingesetzt. Mit steigender Bakterienanzahl in Kulturansatz erhöht sich die mathematische Wahrscheinlichkeit zur Infektion der Zellen, wobei Inkubationsdauer und die Virulenz des verwendeten Laborstamms auch einen Einfluss auf die resultierende Vermehrung der Bakterien haben.

Bislang wurde das Testsystem des MGIA mit *M. tuberculosis* nur in murinen Splenozyten (75-77) oder murinen Knochenmarksmakrophagen (78) eingesetzt, um vakzininduzierte Veränderungen der antimykobakteriellen Aktivität gegen *M. tuberculosis* zu untersuchen. In menschlichen Zellen wurde der MGIA bisher mit *M. bovis* BCG entweder in PBMC oder in Vollblut durchgeführt (73, 74, 80). Die vorliegende Arbeit ist somit die erste Beschreibung des MGIA unter Verwendung von *M. tuberculosis* H37Rv in menschlichen Zellen und wird in der Aussagekraft weiter durch die parallele Untersuchung zweier humaner Immunkompartimente, der PBMC und der humanen BALC, ergänzt.

Im Vergleich zu den zuvor erwähnten Studien, in denen eine MOI von ca. 0,0001 und 0,0002 eingesetzt wurde, ist die in der aktuellen Studie verwendete MOI von 0,058 höher. Um sicherzustellen, dass diese MOI die Messung einer Änderung in der Wachstumskontrolle ermöglicht, wurde Vitamin D als Positivkontrolle in die Experimente mit aufgenommen.

Es wurde ein Vitamin D abhängiger durchschnittlicher TTP-Anstieg um mindestens 17,2 Std. in beiden Zellgruppen beobachtet (Abbildung 16). Daraus wurde abgeleitet, dass bei der verwendeten MOI von 0,058 jede potentielle Vakzin-abhängige antituberkulöse

Reaktion als Verlängerung der TTP nachweisbar gewesen wäre. Dieser Effekt konnte durch Verabreichen der *M. bovis* BCG-Impfung allerdings nicht erzielt werden. Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche experimentelle Bedingungen, wie z. B. die Verwendung einer niedrigeren MOI, zu anderen Ergebnissen führen könnte. Diese Arbeit deutet jedoch darauf hin, dass die Art der Bakterien im MGIA berücksichtigt werden muss. Mehrere Autoren haben gezeigt, dass die *M. bovis* BCG-Impfung von menschlichen Individuen eine Wachstumshemmung von *M. bovis* BCG *in vitro* induziert, wohingegen die experimentellen Daten darauf hindeuten, dass die *M. bovis* BCG-Impfung nicht zu einer Wachstumskontrolle von *M. tuberculosis* durch menschliche PBMC und BALC führt.

9.3.5 Interpretation der unterschiedlichen Kultivierungssysteme MGIT und CFU

Die TTP in BALC war in PBMC niedriger als die TTP in PBMC, was eine höhere Wachstumsrate in BALC impliziert. Dieser Effekt wurde in den CFU Auslesungen nicht beobachtet, was darauf hinweisen könnte, dass CFU und TTP unterschiedliche Bedingungen messen. Das MGIT Gerät misst eine steigende Fluoreszenz, wenn aktiv atmende Mikroorganismen den Sauerstoff verbrauchen. Im Vergleich dazu dokumentieren CFU die mykobakterielle Kolonien auf Agarplatten, wobei *M. tuberculosis* typischerweise eugon, in fest anhaftenden, beigen, trockenen Kolonien wächst, sich aber in der Koloniegröße unterscheiden kann. Letztere Beobachtung kann auf einen wesentlich verringerten Replikationsstatus einer gegebenen kleinen oder winzigen Kolonie hindeuten. Mikrobiologen haben diese winzigen Zellpopulationen als persistierende oder ruhende, nicht wachsende Bakterien mit der Fähigkeit zu überleben beschrieben, die aber nicht kultivierbar sind (154, 155). In Bezug auf *M. tuberculosis* wurde gezeigt, dass die Replikationsrate bei kleinen Kolonietypen von *M. tuberculosis* beim Persistenztyp im Vergleich zu einer Population größerer kulturverwertbarer Mykobakterien reduziert ist (156). *In vivo* replizierende und ruhende Bakterienpopulationen existieren innerhalb desselben Patienten (156-158). Es ist möglich, dass kleine, langsam replizierende Kolonien in der CFU-Analyse gezählt werden aber im MGIT-Test unterschätzt werden, da dieser den Metabolismus- und Wachstumsraten durch Sauerstoffverbrauch dokumentiert. Dies könnte die beobachteten Unterschiede zwischen der TTP- und CFU-Analyse erklären.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass *in vitro* Experimente mit PBMC ein unzureichendes Modell für die zellbasierten Immunantworten und die Kontrolle bei menschlicher TB sind (89, 159, 160).

9.3.6 Einschränkungen der Vitamin D - Versuche

Die Konzentration von Vitamin D war mit einer Endkonzentration von 3 nmol/L im Vergleich zu anderen Studien hoch (141, 161, 162). Die verwendete Menge überschreitet auch das physiologische Maß (163, 164) und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den beobachteten Ergebnissen um unspezifische Effekte handelt. Es ist trotz des relevanten Verdünnungseffektes in den Nährmedien nicht auszuschließen, dass Vitamin D in der vorliegenden Arbeit die Mykobakterien direkt im Wachstum hemmt, anstatt die zelluläre Wachstumskontrolle zu verstärken.

Ethikvotum



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Prof. Dr. med. Lange
Forschungszentrum Borstel
Parkallee 35
23853 Borstel

Ethik-Kommission

Vorsitzender:

Herr Prof. Dr. med. A. Katalinic
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. F. Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Geschäftsstelle: Frau Dr. phil. A. Hüppe
Tel.: +49 451 500 4639
Fax: +49 451 500 3026

ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 14-091

Datum: 10. Juni 2014

Sitzung der Ethik-Kommission am 05. Juni 2014

Antragsteller: Herr Prof. Dr. Lange

Titel: *Mycobacterial Growth Inhibition Assay (MGIA) an humanen Alveolarmakrophagen als Korrelat protektiver Immunität gegenüber einer pulmonalen Tuberkulose*

Sehr geehrter Herr Professor Lange,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Aufgrund der in der Diskussion mit den Antragstellern gewonnenen Informationen sowie den vorgenommenen Überarbeitungen der Antragsunterlagen hat die Kommission **keine Bedenken** mehr gegen die Durchführung des Studienvorhabens.

Sie gibt noch folgende **Hinweise**: In die Studieninformation ist noch der Einsatz von Propofol im Rahmen der Bronchoskopie (samt Risiken) aufzuklären. Es wird empfohlen, im Rahmen der Abklärung eines Immundefektes neben der bereits geplanten Abnahme eines Blutbildes auch eine Lymphozytentypisierung sowie Immunglobuline und Impftiter zu bestimmen. Auf die - wenn auch geringe - Wahrscheinlichkeit eines Geschwürs (Ulceration) ist hinzuweisen.

Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muss die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß bin ich


Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

☒ Herr Prof. Dr. Katalinic
(Sozialmedizin u. Epidemiologie)
☒ Herr Prof. Dr. Gieseler
(Onkologie)
Herr Prof. Dr. Barkhausen
(Radiologie und Nuklearmedizin)
Herr Dr. Bausch
(Chirurgie)
Herr Prof. Dr. Borck
(Med. u. Wiss.geschichte)
☒ Frau Farries
(Richterin Amtsgericht Lübeck)

☒ Herr Dr. Fieber
(Richter Amtsgericht Reinbek)
☒ Frau Jacobs
(Pflege, PIZ)
☒ Frau PD Dr. Jauch-Chara
(Psychiatrie)
☒ Herr PD Dr. Lauten
(Kinder- und Jugendmedizin)
☒ Herr Prof. Dr. Moser
(Neurologie)

☒ Herr Prof. Dr. Rehmann-Sutter
(Med. u. Wiss.geschichte)
☒ Frau Prof. Dr. Schrader
(Plastische Chirurgie)
Herr Prof. Dr. Schwaninger
(Pharmakologie)
☒ Frau Prof. Dr. Stubbe
(Theologie)
☒ Herr Dr. Vonthein
(Medizinische Biometrie)
☒ Frau Prof. Zühlke
(Humangenetik)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig in Inhalt und Form verfasst und keine weiteren, als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Borstel, den 13.01.2021

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. med. Barbara Kalsdorf für die Bereitstellung des Themas, die exzellente Betreuung und Unterstützung in allen Phasen der Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. Dr. Christoph Lange sehr für die Bereitstellung der Ressourcen, sowie die kontinuierliche und vielseitige Förderung.

Ich danke allen Mitarbeitern und Kollegen der Forschungsgruppe Klinische Infektiologie, im besonderen PD Dr. med. Jan Heyckendorf, Dr. Patricia Sanchez-Carballo, Jessica Hofmeister, Franziska Daduna und Lukas Busenbender.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Nationalen Referenzzentrums für Mykobakteriologie, insbesondere Dr. Elvira Richter und Anne Witt für die herausragende Unterstützung.

Ich bedanke mich bei allen Kollegen der unterschiedlichen Forschungsgruppen des Forschungszentrums Borstel für die unmittelbare Hilfsbereitschaft und die fortlaufend sehr produktive und freundliche Zusammenarbeit, im Besonderen möchte ich PD Dr. Norbert Reiling, Doreen Beyer und Lisa Niwinski hervorheben.

Dr. Lize Van der Merwe, ehemals Stellenbosch Universität in Südafrika, danke ich für die Hilfe bei der Erstellung des statistischen Modells.

Dem Deutschen Zentrum für Entzündungsmedizin danke ich für das DZIF-MD-Stipendium.

Allen Probanden, die sich für diese Studie freiwillig und mehrfach untersuchen ließen, möchte ich danken.

Meiner Familie danke ich sehr.

Verzeichnis der eigenen Veröffentlichungen

Arbeiten

Mycobacterium growth inhibition assay of human alveolar macrophages as a correlate of immune protection following *M. bovis* BCG-vaccination

Juliane Radloff, Jan Heyckendorf, Lize van der Merwe, Patricia Sánchez-Carballo, Norbert Reiling, Elvira Richter, Christoph Lange, Barbara Kalsdorf | Frontiers in Immunology | 9 | 1708 | 2018 | doi: 10.3389/fimmu.2018.01708

Die EndTB Strategie der WHO: Mind the Gap! Welt ohne Tuberkulose – warum die EndTB-Strategie der WHO so schwierig ist

Constanze Born, Christoph Lange, Jan Heyckendorf, Christian Herzmann, Gunar Günther, Hans-Peter Grobbel, Niklas Köhler, Juliane Radloff, Maja Reimann, Helmut Salzer, Patricia Sánchez-Carballo, Dagmar Schaub | PneumoNews | 2018

Freie Vorträge mit Ergebnissen dieser Doktorarbeit

27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases der European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) in Wien, Österreich 22-25.04.2017

58. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP) in Stuttgart, Deutschland 22-25.03.2017

DZIF Annual Meeting Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF)-Kongress in Köln, Deutschland 24-26.11.2016

Poster-Präsentationen mit Ergebnissen dieser Doktorarbeit

Tag der Deutschen Zentren der Gesundheitsforschung der Universität zu Lübeck
Lübeck, Deutschland 30.11.2018

Uni im Dialog der Universität zu Lübeck

Lübeck, Deutschland 28.06.2017