

Untersuchung der zellulären Immunität bei Patienten mit Zoster im Vergleich zu alters- und geschlechtsangepassten Varicella-Zoster Virus-seropositiven Trägern

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock
vorgelegt von Regina Antonia Ebert geb. Baukholt in Dorsten



Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität
Rostock

Bürgerende, Februar 2015

Dekan:
Herr Prof. Dr.med. E. Reisinger

1. Gutachter:
Herr Prof. Dr. med. S. Emmert
(Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Universität Rostock)

2. Gutachter:
Frau Prof. Dr. rer nat. B. Müller-Hilke
(Institut für Klinische Immunologie, Universität Rostock)

3. Gutachter:
Herr Prof. Dr. med. M. Jünger
(Klinik für Hautkrankheiten, Universität Greifswald)

Verteidigung: 10. Februar 2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Geschichte und Bedeutung des Varicella-Zoster Virus	6
1.2	Klinik der Varicellen und des Herpes Zoster	7
1.3	Entwicklung eines Zoster-Impfstoffes	10
1.4	Biologie und Pathogenese des Varicella-Zoster Virus	11
1.5	Einführung in das Immunsystem	12
1.6	Nachweismethoden des Varicella-Zoster Virus	17
1.6.1	Einführung in den ELISPOT-Assay	19
1.7	Ziel der Arbeit	22
2	Material und Methodik	24
2.1	Untersuchungsprogramm	24
2.1.1	Studienpatienten	25
2.1.2	Anamnese und Laboruntersuchungen	26
2.2	ELISPOT-Assay Anwendung	28
2.2.1	PBMC-Isolierung	29
2.2.2	Prinzip des ELISPOT-Assays und der MACS-Cell-Separation	30
2.2.3	Praktische Durchführung des ELISPOT-Assay	33
2.3	Auswertung des ELISPOT-Assay	36
2.4	Statistik	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Darstellung der Ergebnisse	40
3.2	Aktenstudium	41
3.2.1	Altersklassen und Geschlecht	42

3.2.2	Dermatome	44
3.2.3	Schmerzskala	46
3.3	Untersuchungsbögen	47
3.4	Blutbild und mikroskopische Differenzierung	48
3.4.1	Lymphozyten	48
3.4.2	Thrombozyten	48
3.4.3	Eosinophile Granulozyten	49
3.4.4	Neutrophile Stabkernige	50
3.5	Immunstatus	52
3.5.1	Gesamt-Lymphozyten	52
3.5.2	T-Lymphozyten	53
3.5.3	B-Lymphozyten	55
3.5.4	T-Suppressorzellen	56
3.5.5	T-Helferzellen	58
3.5.6	Aktivierte T-Zellen	59
3.5.7	NK-Zellen (CD 16+, CD 56+)	61
3.5.8	NK-Zellen (CD3+, CD16+, CD56+)	63
3.5.9	CD4/CD8-Ratio	65
3.6	Serologie	66
3.6.1	VZV Immunglobulin G	66
3.6.2	VZV Immunglobulin M	67
3.7	ELISPOT-Assay Ergebnisse	68
3.7.1	VZV-spezifische T-Zellantwort	69
4	Diskussion	73
4.1	Allgemeine Aspekte	73
4.1.1	Aspekte zur Auswahl der Studienpatienten und des Studiendesigns	73
4.1.2	Aspekte zur Methode des ELISPOT-Assay	75
4.2	Aktenstudium	80
4.3	Untersuchungsbögen	82
4.4	Blutbild und mikroskopische Differenzierung	84
4.5	Immunstatus	87
4.6	Serologie	92
4.7	ELISPOT-Assay	94
4.8	Ausblick	98

5 Zusammenfassung	100
6 Anhang	102
6.1 Patienteneinwilligung	103
6.2 Untersuchungsbögen	104
6.3 Laboruntersuchungen	107
6.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	111
6.4.1 Zusammenfassung Aktenstudium	111
6.4.2 Zusammenfassung Untersuchungsbögen	112
6.4.3 Zusammenfassung Blutbilder	114
6.4.4 Blutbild Vergleich innerhalb der Probandengruppen nach Geschlecht	116
6.4.5 Zusammenfassung Immunstatus	117
6.4.6 Zusammenfassung Serologie	123
6.4.7 Zusammenfassung ELISPOT-Assay	125
6.5 Varicella-Zoster Virus Gentypisierung	127
6.6 Übersicht laborspezifische Referenzwerte	128
6.7 Abkürzungsverzeichnis	129
Abbildungsverzeichnis	134
Tabellenverzeichnis	135
Literaturverzeichnis	153
Selbstständigkeitserklärung	154

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Geschichte und Bedeutung des Varicella-Zoster Virus

Das Varicella-Zoster Virus (VZV) ist ein weltweit vorkommendes Virus, welches von Mensch zu Mensch weitergegeben wird. Der Mensch ist damit das einzige Reservoir des Virus. Das Varicella-Zoster Virus wird aerogen übertragen und wurde früher der Erkrankung der Pocken zugeschrieben. Daher wird eine Erstinfektion mit dem Virus auch als "Windpocken" bezeichnet (D. Sennert 17. Jahrhundert). Erstmals beschrieben wurde die Erkrankung 1542 in Italien (Huebener, 1852). Der Arzt W. Heberden differenzierte später die Varicellen eindeutig von den Pocken (übertragen durch Orthopoxvirus variola) (Hengel, 2009). Eine histologische Beschreibung erfolgte 1894 durch den Hamburger Dermatologen Gerson Unna. In einem klinischen Humanexperiment wurde in den 30er Jahren die Kausalität zwischen der exogenen Primärinfektion in Form von Windpocken und einer späteren endogenen Reaktivierung des VZV in Form eines Herpes Zoster erkannt. 1947 konnte das Varicella Zoster Virus in elektronenmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen werden (Nagler and Rake, 1948).

In Deutschland erkranken jährlich 750.000 Menschen am Varicella-Zoster Virus. Damit ist diese Virusinfektion eine der häufigsten impfprävalenten Krankheiten in Deutschland. Seit dem 29.03.2013 besteht gemäß IfSG (Infektions Schutz Gesetz) eine Meldepflicht für den Krankheitsverdacht, die Erkrankung und den Tod an Varicellen (Robert-Koch-Institut, 2013). In diesem Kontext hat die Ständige Impfkommission des Robert-Koch-Institut im Jahr 2004 die generelle Empfehlung zur Standardimpfung im Kindesalter gegen VZV zur Senkung der Morbidität ausgesprochen. Weiterhin sollen vielfältige Varicellen-assoziierte Komplikationen, die Rate der Hospitalisierungen und auch ökonomische Belastungen durch die Impfeinführung reduziert werden (Robert-Koch-Institut, 2004). Mehrere Untersuchungen auf Basis empirischer Daten und mathematischer Modelle bekräftigten den gesundheitlichen und ökonomischen Nutzen der Schutzimpfung (Banz et al., 2003; Wagenpfeil et al., 2004).

Das Varicella-Zoster Virus verursacht als Primärinfektion die Varicellen und persistiert in sensorischen Nervenzellganglien (Chen et al., 2003). Die endogene Reaktivierung des Varicella-Zoster Virus manifestiert sich klinisch als Herpes Zoster (Lungu et al., 1995). Das Risiko der Reaktivierung steigt mit erhöhtem Alter und bei immunsupprimierten Patienten deutlich an (Ragozzino et al., 1982; Rusthoven et al., 1988; Buchbinder et al., 1992). Die Inzidenz des Herpes Zoster beträgt jährlich 1-5 Fälle pro 1.000 Einwohner in Deutschland (Kempf and Lautenschlager, 2001).

Eine der wichtigsten Komplikationen des Herpes Zoster stellt die Post-Zoster-Neuralgie dar, welche 10-20% aller Patienten mit Zoster betrifft (Gross et al., 2003). Daraus folgt, dass hohe Kosten für das Gesundheitssystem im Zusammenhang mit der Erkrankung Herpes Zoster entstehen (Goldman, 2005).

1.2 Klinik der Varicellen und des Herpes Zoster

Um aufzuzeigen, wie beeinträchtigend eine Zoster Erkrankung für den Patienten sein kann, soll hier kurz die Ersterkrankung Varicellen und dann das klinische Bild des Herpes Zoster vorgestellt werden.

In der Regel beträgt die Inkubationszeit nach Erstkontakt mit dem Varicella-Zoster Virus bis zum Ausbruch der Varicellen ("Windpocken") 14-16 Tage. Die Patienten sind 1-2 Tage vor Auftreten des klassischen Exanthem bis zu sieben Tage nach Auftreten der letzten Effloreszenzen ansteckend. Das juckende Exanthem tritt in Form eines "Sternenhimmels" auf, d.h. es zeigen sich gleichzeitig am Körper Effloreszenzen in verschiedenen Entwicklungsstadien wie Papeln, Bläschen und Krusten. Die typischen Effloreszenzen treten zuerst am Körperstamm und im Gesicht auf, greifen dann jedoch schnell auf den restlichen Körper, den behaarten Kopf und die Schleimhäute über. Als Allgemeinsymptome leiden betroffene Patienten unter mäßigem Fieber (selten über 39°C). Die Erkrankung dauert in der Regel drei bis fünf Tage. Treten keine bakteriellen Superinfektionen als Komplikation auf, heilen die Effloreszenzen in der Regel narbenfrei ab (Robert-Koch-Institut, 2013).

Die Erkrankung Herpes Zoster spiegelt die endogene Reaktivierung des persistierenden Varicella-Zoster Virus wieder. Die Erkrankung beginnt in über 80 % der Fälle mit unspezifischen Prodromi wie Hyperästhesie, Parästhesie, Brennen und Schmerzen des betroffenen Dermatome. Ein Dermatome ist ein segmentales Hautareal, welches sensorisch von einem Spinalnerven innerviert wird. Die Prodromi dauern in der Regel ein bis fünf Tage an.

Nach dieser Prodromalphase beginnt die kutane Manifestation mit schmerzenden Bläschen auf erythematösen Grund. Die Pustulae sind in der Regel herpetiform gruppiert, können jedoch auch konfluieren. Charakteristisch für den Herpes Zoster ist das Auftreten in einem oder mehreren Dermatomen. Der Zoster tritt einseitig auf und überschreitet selten die Mittellinie. Auf Grund dieser klinischen Erscheinung wird die Erkrankung im Volksmund auch häufig "Gürtelrose" genannt, da die Dermatome streifenförmig auf dem menschlichen Körper

angeordnet sind. Im Verlauf können aus den Bläschen Erosionen und Ulcerationen entstehen, sowie sekundäre Effloreszenzen wie Krusten. Außerdem können sich hämorrhagische Pusteln und lokale Nekrosen entwickeln. Die Abbildung 1.1 zeigt exemplarisch einen Patienten mit einem ausgeprägten Herpes Zoster im zervikalen Bereich. Die kutane Manifestation des Zosters dauert bei immunkompetenten Patienten bis zur Abheilung unter Krusten ca. 2-3 Wochen. Da eine Ansteckungsgefahr durch eine Schmierinfektion besteht, endet die Infektiosität erst mit einer Krustenabheilung.



Abbildung 1.1: Foto eines Herpes Zoster im zervikalen Dermatome C2 und C3. Zu sehen sind Pustulae auf erythematösem Grund mit z.T. hämorrhagischen Bläschen

Die am häufigsten betroffenen Dermatome sind die Thorakalen (von Th3) und die Lumbalen (bis L1). Weiter findet oftmals eine Reaktivierung im Bereich des Nervus trigeminus statt. Hier ist besonders in der Häufigkeit eine Erkrankung im ersten seiner drei Äste, dem Nervus ophthalmicus hervorzuheben. In der Altersverteilung tritt bei jüngeren Patienten häufiger der Herpes Zoster in den thorakalen Segmenten auf. Bei Patienten über dem 50. Lebensjahr wird öfter eine Erkrankung des Nervus trigeminus und den sakralen Dermatome gefunden. Bei immuninkompetenten Patienten zeigt sich hingegen vermehrt ein disseminierter Befall. Die Patientengruppe der Immuninkompetenten wurde jedoch nicht in dieser Arbeit untersucht. Deshalb soll nicht näher auf die Klinik und Komplikationen dieser Patientengruppe eingegangen werden und auf die Tabelle 1.1 verwiesen werden.

Neben den lokalen Hauterscheinungen sind die Patienten mit einem akuten Zoster besonders durch Schmerzen beeinträchtigt. Die Schmerzstärke variiert stark im Vergleich zwischen den Patienten. Von einer Postzoster Neuralgie kann bei

	kutane & mukokutane Manifestationen	Nervensystem	Auge	viszerale Organe
akute Komplikationen	• bakterielle Sekundärinfektionen • Zoster haemorrhagicus • Zoster gangraenosus • Zoster generalisatus	• Encephalitis • Meningitis • granulomatöse Arteritis • segmentale Paresen • Faszialisparese bei Zoster oticus	• Konjunktivitis • Episkleritis/Skleritis • Uveitis • Keratitis • Iridozyklitis	• Pneumonie • Ösophagitis • Myokarditis • Enterokolitis • Pankreatitis • Arthritis
chronische Komplikationen	• atrophische, hypertrophische Narben • Hypo-/Depigmentati on • granulomatöse Hautläsionen • Pseudolymphom • Psoriasismanifestation	• Postzoster • Neuralgie • Guillain-Barré-Syndrom • Myelitis	• Keratitis • Chorioretinitis • Retrobulbärneuritis • Vaskulitis • Panophthalmitis • Nervus opticus • Atrophie	• Arthritis

Tabelle 1.1: Komplikationen bei Herpes Zoster. Modifiziert nach (Gross and Doerr, 2006a)

persistierenden Schmerzen zwölf Wochen nach Abheilung der Effloreszenzen gesprochen werden.

Häufige Komplikationen finden sich auf der Haut (z.B. bakterielle Sekundärinfektion, Hyper- oder Hypopigmentierung), im Auge und dem zentralen Nervensystem. Viszerale Organe sind sehr selten betroffen. Als wichtigste und häufigste Komplikation ist jedoch der akute Schmerz und die Postzoster Neuralgie zu nennen. Häufiger betroffen von Komplikationen sind immuninkompetente Patienten. (Gross and Doerr, 2006a) Die Tab.1.1 zeigt die wichtigsten Komplikationen in einer Übersicht.

1.3 Entwicklung eines Zoster-Impfstoffes

Strategien zur Vermeidung eines Herpes Zosters folgern einen gesundheitlichen Benefit für den Patienten und den volkswirtschaftlichen Nutzen. Um dieses Ziel zu erreichen, kann eine Schutzimpfung bei der Primärinfektion des Varicella-Zoster Virus (Windpocken) und bei der Reaktivierung (Herpes Zoster) eingesetzt werden.

Die Effektivität der VZV-Schutzimpfung gegen Windpocken bei Kindern und Erwachsenen nach Einführung in Deutschland im Jahr 2004 konnte in mehreren Studien belegt werden (Ampofo et al., 2002; Watson, 2008; Broyer et al., 1997). Bereits vier Jahre nach Einführung der Schutzimpfung gegen Windpocken zeigte sich eine deutliche Reduktion der Varicellenmorbidity in Deutschland. Bei der Einführung der VZV-Impfung in Deutschland wurde angenommen, dass eine VZV-Impfung auch ausreichend gegen Herpes Zoster schützt (Jumaan et al., 2005).

Levin et al. untersuchten den direkten Effekt einer Impfung auf das Immunsystem, also die zellvermittelte Immunität gegen das Varicella-Zoster Virus nach einer VZV-Impfung bei älteren Menschen. Dafür verwendeten sie vergleichend den γ - Interferon Enzyme linked immunospot assay (ELISPOT-Assay) und den Responder cell frequency assay (RCF-Assay). Dabei zeigte sich zum Einen, eine deutlich höhere Sensitivität und dynamische Bandbreite des ELISPOT-Assay gegenüber dem RCF-Assay. Zum Anderen konnte nach der Impfung eine gestiegene zellvermittelte Immunität gegen VZV gemessen werden. Man kann von einem Post-Booster-Effekt ausgehen (Levin et al., 2003).

Basierend auf der klinischen Bedeutung des Herpes Zoster und der Möglichkeit eines Booster-Effektes wurde 2005 ein Impfstoff gegen Herpes Zoster entwickelt. In dieser Entwicklung spiegelt sich die Aktualität der Bedeutung des Herpes Zosters wieder und auch die Brisanz der in dieser Arbeit dargelegten Thematik. Oxman et al. veröffentlichte 2005 erstmals die Daten zur neuen Zoster-Impfung (ZostervaxTM) (Oxman et al., 2005). Bei den geimpften Studienteilnehmern zeigte sich in einer randomisierten, doppelblinden Studie (gesunde Personen über 60 Jahren) eine deutlich geringere Morbidity und eine erniedrigte Inzidenz von Postzoster-Neuralgie gegenüber der Placebo-Gruppe. Eine Veröffentlichung im Jahr 2008 von Oxman et al. bestätigt die Ergebnisse. Insgesamt konnte die Impfung die Erkrankung um 61.1% und die Post-Zoster-Neuralgie um 66.5% senken (Oxman and Levin, 2008).

1.4 Biologie und Pathogenese des Varicella-Zoster Virus

Das Varicella-Zoster Virus (VZV) gehört zur Gruppe der Herpesviridae. Diese Gruppe wird weiter in die Subklassen Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae und Gammaherpesvirinae untergliedert. Eine Einteilung in diese Klassen erfolgt unter anderem nach dem Wirtsspektrum, dem zytopathogenetischen Effekt und Merkmalen des Replikationszyklus. Das VZV gehört zusammen mit dem Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV 1) und Herpes Simplex Virus Typ 2 (HSV 2) zu den Alphaherpesvirinae (Quinlivan and Breuer, 2006; Norberg, 2010).

Die Architektur der Herpesviridae ist gleichartig. Es zeigt eine polygonale oder runde Form mit einem sichtbaren zentralen Kern. Das Virion besteht aus der Glykoproteinhülle, einem kubischen Kapsid und dem Kern aus linearer dsDNA (doublestrand Desoxyribonukleinacid). Die Glykoproteine spielen eine besondere Rolle bei der Interaktion mit der menschlichen Zelle. So bilden gC und gE ein Dimer, um einen Rezeptor zu bilden. Die genauen Rezeptoren zur Adsorption der Viruszelle an die Wirtszelle sind bisher noch nicht genau entschlüsselt. Eine Rolle könnte der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor spielen. (Gross and Doerr, 2006a; Harper et al., 1998)

Replikationszyklus Der Zyklus in dem das Virus sich vervielfältigt wird in verschiedene Phasen unterteilt. In der ersten Phase wird das Virus durch die Wirtszelle adsorbiert. Nach dem Uncoating (Freisetzung von Nukleinsäure) wird das Nukleokapsid an die Kernmembran transportiert und dort im Zellkern freigesetzt. In der zweiten Phase erfolgt die Transkription (Umschreiben des Gen von DNA in RNA) und Translation (Proteinbiosynthese) der Virus-DNA. Im letzten Schritt wird das neue Virion zusammengebaut und aus der Zellmembran ausgeschleust.

Nachdem das Virus mit Hilfe der Glykoproteine adsorbiert wurde, wird das Nukleokapsid vermutlich entlang von intrazellulären Mikrotubuli und Mikrofilamenten (z.B. Aktinfäden) an die Kernmembran transportiert. Dieser Mechanismus ist bei HSV bekannt und wird daher auch für das VZV vermutet. Durch Membranporen wird nun die Virus-DNA in den Kern geschleust.

Die Gene werden in einer genauen zeitlichen Kaskade (IE-Gene = immediate-early protein, E-Gene = early genes und L-Gene = late genes) produziert. Nach der Reproduktion, werden sie nun in einem Kapsid verpackt und aus dem Zellkern des Wirts geschleust. Dieser Mechanismus ist noch nicht genau bekannt, es existieren mögliche Hypothesen. In Vesikeln erfolgt nun im Zytoplasma der Zusammenbau des Virion. Über Exozytose können die Viruspartikel nun die Zelle verlassen. (Gross and Doerr, 2006a; Loeffler, 2000)

Persistenz im Organismus und Reaktivierung Die genauen Mechanismen der Persistenz des Varicella-Zoster Virus sind nicht vollkommen bekannt. Die Funktion und Wirkungsweise von regulierenden Proteinen, die eine Persistenz in Ganglienzellen erlauben, sind unbekannt.

Die primäre Manifestation (Windpocken) des VZV findet meist im Kindesalter statt. Die Kinder stecken sich über eine Tröpfcheninfektion an. Das Virus

wird zunächst in lokalen Lymphknoten vermehrt und tritt dann später in die Blutbahn ein. Jetzt erfolgt auch eine Hautmanifestation (Siehe 1.2.). In den infizierten Hautzellen können IE-, E- und L-Gene nachgewiesen werden. Noch während dieser Hautmanifestation erfolgt ein retrograder Rücktransport über sensible Nerven in Nervenzellganglien. In diesen Nervenzellganglien können die Viren persistieren. Dabei werden IE- und E-Gene des Varicella-Zoster Virus in den Nervenzellganglien exprimiert. Wird die Latenzphase aufgehoben, werden auch L-Gene produziert und die vollständige Replikation kann stattfinden. Die neuen Viren wandern nun anterograd von den Nervenzellganglien in die von ihnen innervierten Dermatome. Die in dem entsprechenden Dermatome liegenden Hautzellen werden infiziert, und der Herpes Zoster tritt klinisch in Erscheinung. Warum die Latenzphase aufgehoben wird und genaue Mechanismen dieser Reaktivierung sind bisher unverständlich. (Gross and Doerr, 2006a; Cohrs et al., 2004)

Virustypen Man findet beim Varicella-Zoster Virus den VZV-Wildtypen (VZV-WT) und den Oka-Vaccine-Stamm (VZV-Oka). Der Oka-Stamm wurde in Japan bei einem Kind mit Varicellen isoliert. Beim Oka-Stamm unterscheidet man weiter den parent Oka Stamm (P-Oka) und den Vaccine Oka Stamm (V-Oka) (Yamanishi, 2008). Aus dem V-Oka sind z.B. die Impfstoffe Varilrix und Varivax (Glaxo Smith Kline Biologicals und Merck & Co) entwickelt worden (Tillieux et al., 2008).

Zuerst hatte man weltweit bei den Wildtypen die drei Haupt-Genotypen des Varicella-Zoster Virus nämlich den Europäischen Genotyp (E), den Japanischen Genotyp (J) und den Mosaik Genotyp (M) gefunden (Loparev et al., 2004). Mit einer weiteren phylogenetischen Studie konnte Loparev et al. jedoch zeigen, dass mehr Genotypen existieren. So unterteilt man heute fünf Hauptgruppen und zwei Untergruppen (Loparev et al., 2007).

Sauerbrei et al. überprüften in einer Studie das Vorkommen von VZV-Wildtypen in Deutschland bei Windpocken und Herpes-Zoster Patienten. Dominierend sind in Deutschland für Varicellen der European-Genotyp, jedoch lagen auch afrikanische und asiatische Wildtypen vor. Bei den Patienten mit einem Herpes Zoster fanden sich nicht eine solche Variabilität, sondern hauptsächlich der europäische Wildtypen (Sauerbrei and Wutzler, 2007). In Deutschland findet sich am häufigsten der Genotyp European 2 (Sauerbrei et al., 2008), wie auch im anderen europäischen Raum (Loparev et al., 2009).

1.5 Einführung in das Immunsystem

Die für diese Arbeit relevanten Teile des Immunsystems werden im Folgenden dargestellt.

Das Immunsystem ist ein Abwehrsystem des Körpers, um exogene und endogene Infektionen zu verhindern. Es umfasst also die Eigenschaft, gezielt Infektionen von Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten abzuwehren. Der Körper unterscheidet zwischen fremden Proteinen (z.B. Haptene bei Allergien), fremden Zellen

(z.B. nach Gewebeersatz) und körpereigenen Zellen. Aber auch veränderte körpereigene Zellen (z.B. Tumorzellen) muss das Immunsystem erkennen und eliminieren können. Um zwischen eigenen und fremden Zellen zu unterscheiden, besitzen körpereigene Zellen Oberflächenantigene. Dieser major histocompatibility complex (MHC) wird beim Menschen auch human leucocyte antigen (HLA) genannt, da er bei Leukozyten entdeckt wurde. Man unterscheidet zwischen MHC-I-Molekülen, die sich auf allen kernhaltigen Zellen befinden und MHC-II-Molekülen, welche man bei Immunzellen findet. Die MHC-II-Moleküle befinden sich unter anderem auf B-Lymphozyten und einigen T-Lymphozyten. Diese MHC-II-Moleküle dienen der Kommunikation innerhalb der Immunzellen. MHC-I-Moleküle präsentieren Peptide von Erregern, die sich im Zytoplasma vermehren. MHC-II-Moleküle hingegen binden Peptide, die sich intrazellulär vermehren, sowie Epitope von extrazellulären Erregern und Toxine.

Das Immunsystem kann nach Organen und Anteilen der Immunantwort eingeteilt werden. Primäre Immunorgane sind das Knochenmark und der Thymus. In diesen Organen reifen die Immunzellen heran und es erfolgen Differenzierungen. Bei den sekundären Immunorganen finden sich die Milz, Lymphknoten und kapselfreies lymphatisches Gewebe. Es findet zum Beispiel der Kontakt zwischen den Antigenen und den gereiften Lymphozyten statt. Anteile der Körperabwehr sind humoraler (plasmalösliche Stoffe) und zellulärer (Immunzellen) Art. Es kann weiter in eine unspezifische (angeborene) und eine spezifische (erworbene) Immunantwort unterteilt werden.

Die unspezifische Immunantwort reagiert bei jedem Antigenkontakt stereotyp, indem durch humorale und zelluläre Faktoren körperfremde Zellen durch Zytolyse und Phagozytose eliminiert werden.

Spezifische Immunreaktion heißt, dass der Körper mit einem Antigen stimuliert wird (Primärantwort) und daraufhin Gedächtniszellen gebildet werden. Nach erneutem Antigenkontakt kann der Körper also noch schneller und effektiver reagieren (Sekundärantwort). Die erworbene Immunität bleibt lebenslang erhalten.

Antigenpräsentierende Zellen (dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und B-Lymphozyten) phagozytieren ein Antigen, zerlegen es in Peptidstücke (Prozessierung) und präsentieren es über MHC-Klasse-I-Proteine auf der Zelloberfläche. T-Lymphozyten können nun mit ihrem speziellen Oberflächenrezeptor, dem T-Zell-Rezeptor (TZR) das prozessierte Antigen als fremd erkennen. Durch diese Bindung zwischen TZR und MHC wird die T-Zelle aktiviert. Je nach Typ der T-Zelle kann nun die Ausschüttung von Interleukinen, eine Zytolyse oder eine Suppression der Immunantwort erfolgen. Handelt es sich bei der antigenpräsentierenden Zelle um einen B-Lymphozyt, kann dieser das prozessierte Antigen über MHC-Klasse-II-Proteine auf der Zelloberfläche präsentieren. Aktivierte T-Helferzellen können die B-Zelle in eine B-Gedächtniszelle oder in eine Plasmazelle umwandeln. Plasmazellen können Antikörper bilden. Antikörper sind immunologisch aktive Proteine, die spezifisch gegen ein Epitop (Molekülabschnitt eines Antigens) wirken. (Janeway et al., 2007; Abbas and Lichtmann, 2004; Oethinger, 2004)

Die Tabelle 1.2. gibt einen Überblick über die unspezifische und spezifische Immunreaktion.

	Unspezifische Abwehr	Spezifische Abwehr
<i>Humorale Abwehr</i>	Komplementsystem Interferone	Immunglobuline (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM)
<i>Zelluläre Abwehr</i>	Neutrophile Granulozyten, Makrophagen, NK-Zellen	T-Lymphozyten (T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, T-Suppressorzellen) B-Lymphozyten

Tabelle 1.2: Die unspezifische Immunität und spezifische Immunität bestehen aus humoralen und zellulären Faktoren. Modifiziert nach (Oethinger, 2004)

Zelluläre Abwehr

Immunzellen tragen einen speziellen Oberflächenmarker, den Cluster of differentiation (CD). Damit werden bestimmte Antigenstrukturen auf der Zelloberfläche bezeichnet, die durch den Gebrauch von monoklonalen Antikörpern nachzuweisen sind. Damit können die verschiedenen Immunzellen identifiziert werden. (Bundschuh, 1991).

Unspezifische Immunität

Granulozyten sind Zellen der Granulopoese und Teil der Leukozyten (weiße Blutkörperchen). Sie können nach dem Färbeverhalten ihrer Granula in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilt werden. Man kann sie im Differentialblutbild quantitativ messen.

Die größte Gruppe der Leukozyten sind die neutrophilen Granulozyten, die Krankheitserreger phagozytieren und Entzündungsmediatoren (Chemokine) freisetzen können. Im Blut findet man neutrophile stabkernige (junge) und neutrophile segmentkernige (ältere) Granulozyten. Bei einer Entzündung steigt die Anzahl der Neutrophilen im Blut, ebenso nimmt der Anteil der Stabkernigen zu.

Eosinophile Granulozyten finden ihre Funktion in der Parasitenabwehr, indem sie ihre zytotoxischen Granula entleeren, aber auch zur Phagozytose befähigt sind. Eine Erhöhung der Eosinophilen kann bei einer typischen Infektionskrankheit auf eine beginnende Ausheilung hinweisen. Es findet sich jedoch auch eine Eosinophilie bei Allergien, Kollagenosen und der chronisch myeloidische Leukämie (CML).

Basophile Granulozyten besitzen IgE-Rezeptoren, über welche sie degranulieren können und ihre Granula (enthalten u.a. Histamin, Heparin, Serotonin) ausschütten. Sie spielen damit beispielsweise eine wichtige Rolle bei Allergien.

Makrophagen entstammen ebenfalls der Granulopoese und sind Fresszellen, d.h. sie dienen hauptsächlich der Phagozytose von körperfremden Mikroorganismen oder Proteinen. Dabei setzen sie auch Chemokine frei, welche mit Zytokinen eine lokale Entzündungsreaktion auslösen und andere Entzündungszellen anlockt.

Die phagozytieren Antigene werden auf MHC-II-Molekülen präsentiert.

NK-Zellen sind eine Population der Lymphozyten, gehören jedoch zu der angeborenen Immunität. Non-T-Zellen und Non-B-Zellen können nach der Funktion in natürliche Killerzellen (NK) oder Killerzellen (K) unterteilt werden. NK-Zellen können durch antikörpervermittelte zelluläre Zytolyse virusinfizierte und transformierte Ziellzellen abtöten. Dabei erkennen sie über Fc-Rezeptor gebundene Immunglobuline. Mediatoren der Zytolyse sind dabei Perforin und Granzyme (Abbas and Lichtmann, 2004; Doerner, 2006; Janeway et al., 2007; Male, 2005; Oethinger, 2004).

Spezifische Immunität

Lymphozyten sind Zellen der Lymphopoese, man kann sie in Subpopulationen einteilen, welche in Abb. 1.2 dargestellt sind. Mit einer quantitativen Analyse der Subpopulationen können erste Aussagen über ein normal entwickeltes Immunsystem und die physiologische Funktionstüchtigkeit gemacht werden (Bundschuh, 1991). Zur spezifischen Immunität gehören die T- und B-Lymphozyten.

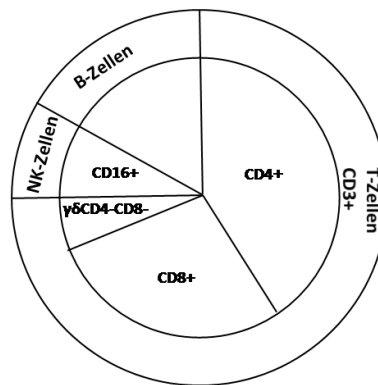


Abbildung 1.2: **Aufteilung der Lymphozyten Subpopulationen im peripheren Blut.** Dabei sind im äußeren Kreis die T- und B-Zellen, sowie die NK-Zellen aufgetragen. Im inneren Kreis sind weiter differenzierbare Populationen dargestellt. Dabei ist graphisch die relative Häufigkeitsverteilung dargestellt. Auf die Differenzierung der B-Zellen wird nicht näher eingegangen, da sie in dieser Arbeit keinen Schwerpunkt darstellt. Modifiziert nach Janeway et al. (Janeway et al., 2007).

T-Lymphozyten sind die zentralen Effektoren der spezifischen zellulären Immunität. Nach ihrer Ausdifferenzierung im Thymus werden sie je nach Oberflächenmarker in die Hauptuntergruppen der CD8+ und CD4+ T-Zellen unterteilt. CD8+ T-Zellen können Antigene über MHC-I-Moleküle erkennen und können danach in zytotoxische T-Zellen differenziert werden. Unter Einwirkung von Interleukinen können zytotoxische T-Zellen die infizierte Zelle lysieren. Zytotoxische T-Zellen erkennen vor allem virusinfizierte Zellen und Tumorzellen. Weitere CD8+ T-Zellen sind T-Suppressorzellen, diese können die Immunreaktion stoppen, um überschießende Immunreaktionen zu vermeiden.

CD4+ T-Zellen erkennen über MHC-II-Moleküle Antigene, welche von antigen-presenting-cells (APC) präsentiert werden. Sie werden nun aktiviert und schütten Zytokine aus. Durch diese Botenstoffe kann die Differenzierung von B-Zellen erfolgen. Es gibt drei Möglichkeiten der weiteren Differenzierung. B-Zellen können sich zu Plasmazellen differenzieren und Immunglobuline ausschütten. Die zweite Möglichkeit ist, dass die B-Zellen die Reifung von zytotoxischen T-Zellen induzieren. Als dritte Option können Makrophagen aktiviert werden. Naive CD4+ T-Zellen können sich ebenfalls unter dem Einfluss von Zytokinen differenzieren. Aktivierte Makrophagen können Interleukin-12 (IL-12) ausschütten, so dass sich Th1-Zellen entwickeln. Die Sekretion von γ -Interferon, IL-2, Tumornekrose-Faktor (TNF) und Lymphotoxin (LT) der Th1-Zellen aktivieren andere Zelltypen und führen zu einer Effektivierung der Abwehr des Erregers. Unter der Sekretion von IL-4 können sich naive CD4+ T-Zellen zu Th2-Zellen differenzieren. Ihre Funktion liegt in der Makrophagenaktivierung (über IL-10, IL-4, IL-13), Aktivierung von eosinophilen Granulozyten (über IL-5) und der Induktion der Immunglobulin E (IgE) Produktion in B-Lymphozyten (über IL-4). Als aktivierte T-Zellen werden solche bezeichnet, die nach Bindung des T-Zellrezeptors an den Antigenbeladenen MHC-II-Molekülen Interleukine ausschütten oder eine Zytolyse oder Suppression auslösen.

Reife B-Lymphozyten exprimieren an ihrer Oberfläche Immunglobuline und stellen somit einen wichtigen Teil der humoralen Immunantwort dar und finden sich in allen sekundären Immungeweben. Sekundäre Immungewebe sind die Gewebe (z.B. Lymphknoten, Milz) wo die Aktivierung der B-Lymphozyten stattfindet. (Abbas and Lichtmann, 2004; Janeway et al., 2007; Male, 2005; Oethinger, 2004)

Immunglobuline Immunglobuline sind Teil der humoralen Immunität, d.h. sie werden nach Antigenerkennung von B-Zellen gebildet. Es werden fünf Hauptklassen unterschieden (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM). Immunglobuline besitzen eine Y-artige Struktur und bestehen aus schweren und leichten Polypeptidketten. Die schweren Ketten bestehen aus α -, δ -, ϵ -, γ -, μ -Ketten, nach denen die Einteilung der Immunglobulinklassen erfolgt. Die leichten Ketten sind unabhängig von der Klasse und bestehen aus κ - oder λ -Ketten. Ein Teil der schweren Ketten wird Fc-Teil (crystallisierbares Fragment) genannt. Der Fab-Teil (antigenbindendes Fragment) ist die Antigenbindungsstelle, somit variabel und besteht aus schweren und leichten Ketten. Für jeden B-Lymphozyten-Klon entstehen nach Antigenkontakt spezifische Immunglobuline.

Immunglobulin G macht den Hauptanteil der Immunglobuline im Serum aus. Es erfüllt die Funktion der sekundären Immunantwort, dass heißt, es sorgt bei erneutem spezifischen Antigenkontakt zur schnellen Sekundärantwort des Körpers. IgG dient z.B. zur Erfolgskontrolle nach Impfungen. Ist ein hoher IgG-Titer vorhanden, kann darauf geschlossen werden, dass der Körper bei erneutem Kontakt mit dem Antigen geschützt ist. IgG kann aber auch zur Überprüfung dienen, ob der Körper sich schon einmal mit einem bestimmten Antigen auseinander gesetzt hat. Erst nach durchgemachter primärer Infektion ist IgG vorhanden. IgG kann den klassischen Weg des Komplementsystems aktivieren und weiterhin als Opsonin wirken.

Immunglobulin M wird bei der primären Immunantwort gebildet. Ein hoher

Titer lässt somit auf eine akute Immunreaktion auf das Antigen schließen. Es aktiviert sehr effektiv das Komplementsystem. (Abbas and Lichtmann, 2004; Janeway et al., 2007; Male, 2005; Oethinger, 2004)

Interferone Interferone sind Teil der Zytokine und werden auch Interleukine genannt. Zytokine werden in Lymphokine und Monokine unterteilt. Lymphokine werden hauptsächlich von T-Lymphozyten gebildet und Monokine von Makrophagen. Hier soll nur auf das Lymphokin γ - Interferon eingegangen werden, da es spezifisch nach dem Antigenkontakt mit dem Varicella-Zoster Virus im enzyme linked immunospot assay (ELISPOT-Assay) nachgewiesen wird.

γ -Interferon ist ein Entzündungsmediator und wird nach antigenspezifischer Aktivierung von Th1-Lymphozyten und NK-Zellen produziert und ausgeschüttet. γ -Interferon hat eine antivirale Wirkung und fördert die Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen auf B-Zellen und Makrophagen. Auf antigenpräsentierenden Zellen erhöht γ -Interferon die Oberflächendichte von MHC-II-Molekülen. Weiterhin kann dieses Zytokin die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen erhöhen und die Differenzierung von B-Zellen fördern. Die Fähigkeiten der Makrophagen, Pathogene zu zerstören, wird ebenfalls erhöht. Da der γ -Interferon-Rezeptor Bindungsstellen für α - und β -Interferon vorweist, kann deren Wirkung verstärkt werden. Auf Th2-Zellen wirkt γ -Interferon inhibierend und intensiviert somit die Immunreaktion von Th1-Lymphozyten. (Callard and Gearing, 1994; Oethinger, 2004; Male, 2005)

1.6 Nachweismethoden des Varicella-Zoster Virus

Die Diagnose des Herpes Zoster wird meist klinisch gestellt, wobei der Virusnachweis mit verschiedenen direkten und/oder indirekten Methoden erfolgen kann.

Um die Verfahren miteinander zu vergleichen werden die Begriffe Sensitivität und Spezifität eingeführt. Die Sensitivität zeigt den Anteil richtig positiver Ergebnisse in einer Nachweismethode beim Vorhandensein eines gesuchten Merkmals (hier VZV-seropositiv) an. Die Spezifität spiegelt den Anteil richtig negativer Ergebnisse wieder.

Direkte Virusnachweismethoden

Als Goldstandard in der Diagnostik von VZV hat sich die Polymerase Chain Reaction (PCR) etabliert. In der PCR wird die DNA, sofern in der Probe enthalten, in vitro vervielfältigt und erhöht somit die Sensitivität des Nachweises. Auch kleinste Mengen an DNA lassen sich somit feststellen.

Andere direkte Nachweismethoden sind die routinemäßig nicht mehr angewendete Suche nach VZV-spezifischen Antigen (Sauerbrei et al., 1999b), die sehr aufwändige Elektronenmikroskopie und die häufig schwierige Virusisolation (Gross and Doerr, 2006c). Die Virusisolation ist zeitaufwendig und besitzt keine klinisch relevante Sensitivität (Sauerbrei et al., 1999a).

Bei dem einfach durchzuführenden Tzanck-Test, der auf zytomorphologischer Beurteilung basiert, wird aus dem Bläschengrund der Effloreszenz mit einem Wattestäbchen Gewebematerial entnommen, auf einem Objektträger aufgetragen und gefärbt (Folkers et al., 1989). Bei einer Infektion mit dem Herpes Simplex Virus oder Varicella-Zoster Virus können zytologisch vielkernige Riesenzellen gesehen werden, jedoch kann kein Unterschied zwischen HSV und VZV Infektion erfolgen (Ozcan et al., 2007). Dabei muss einschränkend bemerkt werden, dass dieser Test eher eine historische Bedeutung hat und von der PCR abgelöst wurde.

Indirekte Virusnachweismethoden

Neben der direkten Darstellung des VZ-Virus bzw. seiner Bestandteile, gibt es auch eine Vielzahl an Tests mit denen die Immunantwort auf das VZ-Virus nachgewiesen werden kann.

Antikörpernachweis Beim ELISA-Test (enzyme linked immunosorbent assay oder auch EIA genannt) erfolgt der quantitative Nachweis von VZV-spezifischen Antikörpern (OBeirne and Cooper, 1979). Dieser Test ist für die klinische Routine ausreichend sensitiv und spezifisch, insbesondere ist er sehr standardisierbar. Zur Bestimmung der VZV-spezifischen Immunität wird der Fluoreszenz-Antikörper-Membran-Antigen-Test (FAMA) angewendet. Dabei reagieren Antikörper in der Probe des Patienten mit VZV-infizierten Zellen. Mit einer Fluoreszenzmikroskopie werden exprimierte Glykoproteine visualisiert. Er wird nur in Speziallabors durchgeführt, da eine Kultivierung von VZV-Zellen notwendig ist (Lafer et al., 2011).

Auch im Neutralisationstest (NT) werden VZV-spezifische Glykoproteine indirekt nachgewiesen. Wenn Antikörper in der Blutprobe enthalten sind, binden diese in vitro an VZV als Antigen ("Neutralisierung"). Wird nun nach Antikörper-Antigen-Reaktion die Probe erneut einem Antigen ausgesetzt, wird das Ausbleiben einer toxischen Wirkung geprüft. Der Test ist ebenfalls schwer durchführbar, da eine Zellkultur benötigt wird und er mehrere Tage dauert. Er ist daher nicht in der Routinediagnostik zu finden, ist jedoch hoch spezifisch (Jelinek, 2012).

Der indirekte Fluoreszenzantikörpertest (IFAT) ist ein Routinetest. Hierbei wird VZV als Antigen auf einem Objektträger fixiert und dann mit dem Patientenserum inkubiert. In der ersten Phase bildet sich ein Antigen-Antikörper-Komplex, der dann in der zweiten Phase mit einem fluorchrommarkierten Anti-Antikörper gebunden wird. Diese Komplexe können mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Der Test ist schnell durchführbar. Da die Auswertung sehr subjektiv erfolgt, ist er nicht sehr reproduzierbar (Jelinek, 2012).

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) ist sehr spezifisch, jedoch wenig sensitiv. Er beruht auf einer Antigen-Antikörper-Bindungsreaktion, bei der es zu einer Veränderung des Fc-Teils des AK kommt, der eine Komplementkaskade aktiviert. Wird jetzt ein Indikatorsystem hinzugegeben, reagiert die Kaskade in einem zweiten Schritt nicht mehr, da sie bereits verbraucht wurde. Eine Unterscheidung zwischen IgM und IgG ist nicht möglich (Jelinek, 2012).

Die Tabelle 6.3 gibt einen kurzen Überblick über die hier beschriebenen Nachweisverfahren für das Varicella-Zoster Virus.

Nachweis in der T-Zelle Der Limiting-Dilution-Assay (LDA) ist eine funktionelle Nachweismethode bei der spezifische T-Zellen mittels Lyse von Zielzellen quantifiziert und erfasst werden. In dem Verdünnungstest wird der Anteil der Zellzahl ohne Reaktion gegen die ursprünglich eingebrachte Zellzahl logarithmisch aufgerechnet. Nachteil bei diesem Verfahren ist die 10-14 tägige Expansion der T-Zellen in vitro (Miura et al., 2008). Er zeigt sich auch als nicht so sensitiv wie der ELISPOT-Assay (Lalvani et al., 1997).

Bei der intrazellulären fluorescence activated cell sorting (FACS) werden die Subpopulationen durch durchflusszytometrische Messungen separiert (Herzenberg et al., 1976). Dabei liegt eine Antigen-Antikörper-Reaktion zu Grunde, bei der mit Fluoreszenzfarbstoff-markierte spezifische Antikörper gemessen werden. Dabei werden die Zellen aufgrund ihrer Größe und Granularität charakterisiert. Vorteil hierbei ist die Möglichkeit der weiteren Spezifizierung einer einzelnen Subpopulation.

Ein weiteres Nachweisverfahren sind die MHC-Peptid-Tetramere und MHC-Peptid-Multimere (major histocompatibility complex = MHC). Hier werden MHC-Peptide mit spezifischem Antigen inkubiert, dann mit Streptavidin vierfach gebunden und mit fluoreszierenden Substanzen markiert (Krishna et al., 1992). Dadurch kann eine Quantifizierung der spezifischen T-Zellen mittels Durchflusszytometrie erfolgen. Dabei zeigt sich diese Methode als sehr sensitiv, insbesondere können mehrere Zytokine nachgewiesen werden (Sun et al., 2003). Die Methode zeigt jedoch keinen Rückschluss auf die Funktionalität der T-Zelle. Der ELISPOT-Assay stellt eine modifizierte Methode zum Nachweis von Antigen-Antikörper-Reaktionen auf dem Prinzip des Enzymimmunoassays ELISA dar. Bei diesem Verfahren verlieren die eingesetzten Antigene oder Antikörper weder ihre immunologischen noch enzymatischen Eigenschaften bei der Reaktion mit den Zielzellen (hier Lymphozyten). Die Zellen aus der Patientenprobe werden in vivo verwendet. Die zu Grunde liegende immunologische Reaktion wird unter Zugabe eines speziellen Enzym-Substrat-Komplexes sichtbar gemacht und dieser quantitativ erfasst (Masseyeff et al., 1993). Hierbei wird die Einzelzebene sichtbar. Zur Erläuterung der Methode sei auf 1.6.1 und 2.2. verwiesen. Eine Übersicht über Vor- und Nachteile der Nachweismethoden in der T-Zelle zeigt Tabelle 1.3.

1.6.1 Einführung in den ELISPOT-Assay

Wie dargestellt, existieren diverse Nachweismethoden der spezifischen Immunität. An dieser Stelle wird ein Überblick über die Geschichte und den Einsatz in der Forschung des verwendeten ELISPOT-Assay gegeben. Weiterhin wird erörtert, warum gerade dieses Verfahren zum Nachweis der Antigen-spezifischen T-Zellen mit dem ELISPOT-Assay verwendet wurde.

Geschichte und Entwicklung des ELISPOT-Assay Im Jahre 1983 wurde der ELISPOT – Assay erstmalig zur Detektion von B-Zellen von Czerkinsky

entwickelt (Czerkinsky et al., 1983). 1988 etablierte die Gruppe um Czerkinsky den Nachweis von γ -Interferon sezernierenden Zellen und entwickelte den heute verwendeten Nitrozelluloseboden zur besseren Durchführbarkeit der Methode (Czerkinsky et al., 1988). Erstmals wurde 1996 mit dem ELISPOT-Assay Tumor- und antigenspezifische T-Zellen nachgewiesen (Herr et al., 1996).

Einsatz des ELISPOT-Assay in der Forschung Heute wird die Technik in vielen Gebieten zum Nachweis antigenspezifischer T-Zellen verwendet. Insbesondere im Bereich der immunologischen Therapie von Tumor- und Autoimmunerkrankungen (Suzuki et al., 1990; Schwitalle et al., 2008; Liu et al., 2008; Kiessling et al., 2002; Schaed et al., 2002; Otto et al., 2005), bei der Entwicklung von Impfstoffen (Hocknell et al., 2002) und chronischen Virusinfektionen. In der Gruppe der Herpesviridae findet er Verwendung bei den Alpha-Herpesvirinae Varicella-Zoster Virus (Smith et al., 2003; Levin et al., 2003, 2008) und Herpes Simplex Virus (Braun et al., 2006; Hosken et al., 2006; Schmid et al., 1997), sowie bei den Beta-Herpesvirinae im Speziellen bei dem Cytomegalie-Virus (Khan et al., 2002; Maecker et al., 2008; Godard et al., 2004). Des Weiteren fand er seine Etablierung bei Forschungen zum HI-Virus (Eriksson et al., 1992; Ramaswamy et al., 2007; Eshofonie et al., 2006; Fondere et al., 2004), Hepatitis-Virus (Anthony et al., 2001; Inoue et al., 1989; Vassilopoulos et al., 2008), Epstein-Bar-Virus (Comin-Anduix et al., 2008; Yang et al., 2000) und bakteriellen Infektionen (de Andrade et al., 2008; Scheibenbogen et al., 1997; Hill et al., 2005; Bontems et al., 2003). Er wird auch im Gebiet der Transplantationsmedizin im Zusammenhang mit der Erkenntnisgewinnung zu Abstoßungsreaktionen verwendet (Kim et al., 2007; Hricik et al., 2003; Bharat et al., 2008a,b).

Kontinuierlich wurde die Methode weiterentwickelt, um die Nachweisbarkeit von Zytokinen und Zellprodukten zu verbessern (Taguchi et al., 1990; Okamoto et al., 1998; Britten et al., 2002; Roennelid and Klareskog, 1997; Meiklejohn et al., 2004). Eine gute Leitlinie findet sich im Handbook of ELISPOT-Methods (Kalyuzhny, 2005). Heute können mittels ELISPOT-Assay verschiedene Sekretionsprodukte ($\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, RANTES, γ - Interferon) von Immunzellen quantitativ und qualitativ gemessen werden (Hutchings et al., 1989; Bharat et al., 2008b, 2007; Sjoewall et al., 2005; Minang et al., 2006; Willeke et al., 1997; Sarawar et al., 1993).

In dieser Arbeit erfolgte der Nachweis von γ - Interferon. Es wird von CD8+ T-Zellen (= Th1-Zellen, zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen) und CD4+ T-Zellen (= Th 2-Zellen) sezerniert (Callard and Gearing, 1994; Bundschuh, 1991). Der Nachweis erfolgte für γ - Interferon, da dieses Zytokin in nahezu allen Phasen der Immun- und Entzündungsreaktion nach Antigen-Kontakt involviert ist (Callard and Gearing, 1994) und mittels ELISPOT-Assay reproduzierbar nachweisbar ist (Zhang et al. (2009)).

Vor- und Nachteile des ELISPOT-Assay Folgende Aspekte spielen eine Rolle für eine Analysemethode: Präzision, Richtigkeit, Vergleichbarkeit, analytische Spezifität und Sensitivität, Praktikabilität und Kosten. Es sollen einige wichtige Punkte herausgegriffen werden.

Vorteil des ELISPOT-Assay ist die bis zu 200fach höhere Sensitivität gegenüber

dem ELISA beim Nachweis von sezernierten Zytokinen (Tanguay and Killion, 1994). Wobei der ELISA die Zytokinkonzentration misst und der ELISPOT-Assay ein Abbild auf Einzelzellbasis darstellt und damit die Anzahl der zytokinsezernierenden Zellen. Weiterhin wird der ELISA für zellfreie Medien genutzt, wohingegen der ELISPOT-Assay als eine Kombination von Immunoassay und Bioassay ist. Er misst also direkt die Funktion der lebenden kultivierten Zellen (Kalyuzhny, 2005). Der ELISPOT-Assay zeigt im Vergleich zum ELISA, intrazytoplasmatischen Methoden und der PCR eine deutliche Überlegenheit bei der Detektion von γ -Interferon sezernierenden T-Zellen vor einer Tetanus-Impfung (Tassinon et al., 2005). Andere Autoren konnten zeigen, dass sich gerade der ELISPOT-Assay für Zellen mit geringer Zytokinsekretion nach Antigen-Kontakt und geringer T-Lymphozyten Anzahl im Blut sehr sensitiv zeigt (Karlsson et al., 2003; Schmitt et al., 1997). Aus diesen Gründen, wurde der ELISPOT-Assay ausgewählt. Zur Durchführung müssen außer einem ELISPOT-Reader und einer sterilen Werkbank keinerlei teuren technischen Geräte zur Verfügung stehen. Damit ist er im Vergleich zu den anderen Nachweismethoden relativ kostengünstig. Nachteile des ELISPOT-Assay ist seine schlechtere Präanalytik (Inkubationszeit von 3 Tagen und damit störanfällig), die fehlende Möglichkeit der weiteren Spezifizierung der Antigen-spezifischen T-Zellen, sowie seine fehlende Automatisierung im Vergleich zum ELISA.

Ein Nachteil bei der intrazellulären FACS ist die Praktikabilität, da ein FACS-Gerät mit Laser vorhanden sein muss. Es erfolgt eine quantitative Darstellung. Prinzipiell ist eine in vitro und in vivo Durchführung möglich.

Gegen die Durchführung dieser Arbeit mit dem LDA spricht die lange Expositionszeit und die in vitro Kultivierung.

Im MHC-Peptid-Tetramere wird nicht die in vivo Funktionalität der T-Zelle wiedergespiegelt.

	Vorteil	Nachteil
ELISPOT	in vivo, Einzelzellebene der T-Zelle	Präanalytik
ELISA	sensitiv, sehr praktikabel da automatisiert und einfach durchführbar	zellfreie Medien, nur Zytokinkonzentration
LDA	quantitativer Anteil antigenspezifischer Zellen	10-14 Tage Expansionszeit (Praktikabilität)
FACS	in vivo und in vitro	Praktikabilität (FACS-Gerät)
MHC-Peptid-Tetramer	direkt Antigen-spezifische T-Zelle	kein Nachweis der T-Zell-Funktionalität

Tabelle 1.3: Übersicht der wichtigsten Vor- und Nachteile der Nachweisverfahren von VZV in der T-Zelle. "In vivo" bedeutet hier die lebende Zelle in der zu untersuchenden Probe.

1.7 Ziel der Arbeit

Hier soll untersucht werden ob eine zelluläre Immunreaktion auf das Varicella-Zoster Virus bei Patienten, die an einem akuten Herpes Zoster leiden, messbar ist.

Dafür wird versucht ein ELISPOT-Assay zum Nachweis der T-Zell-spezifischen Reaktion auf VZV in vivo zu etablieren.

Arvin fasst in einer Hypothese zusammen, dass eine Ursache der Reaktivierung die Abnahme der VZV-spezifischen T-Zellen sein könnte. Die Abbildung 1.3 demonstriert den angenommenen Spiegel von spezifischen T-Zellen über das gesamte Leben. Dabei ist anzunehmen, dass ein Absinken der VZV-spezifischen T-Zellen die Erkrankung Herpes Zoster bedingt (Abb.1.3.) (Arvin, 2005).

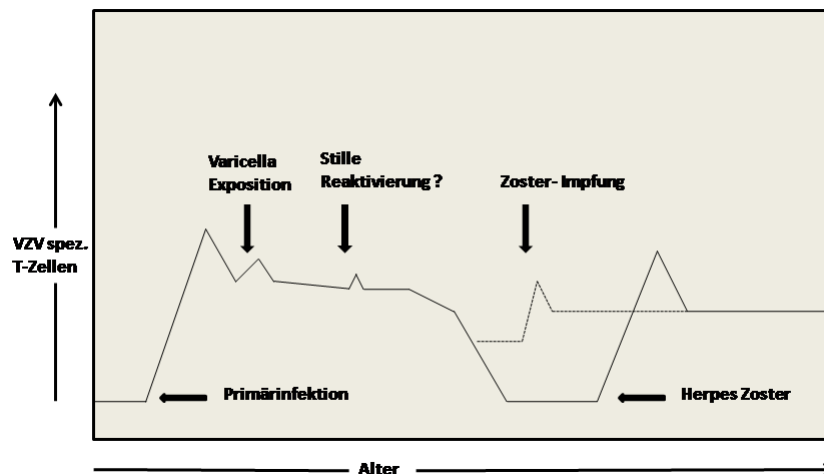


Abbildung 1.3: Dargestellt ist der Spiegel von VZV-spezifischen T-Zellen über das Lebenszeitalter. Nach Primärinfektion mit dem Varicella-Zoster Virus können VZV-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Ein deutliches Absinken der VZV-spezifischen Zellen könnte durch Reexposition und stille Reaktivierung verhindert werden. Mit zunehmendem Alter sinkt die Anzahl der VZV-spezifischen T-Zellen jedoch rapide. Daher wird eine Art Zoster-Schwelle unterschritten und es kommt zur Sekundärmanifestation des Varicella-Zoster Virus, dem Herpes Zoster. Eine Zoster-Impfung könnte mit einem Booster-Effekt den T-Zell Spiegel anheben. Modifiziert nach Arvin (Arvin, 2005).

Als weiteres Ziel dieser Arbeit soll deshalb untersucht werden, ob Unterschiede in der zellulären Immunität zwischen älteren Patienten mit Zoster im Vergleich zu VZV-seropositiven älteren Patienten darstellbar sind.

Dabei stellen sich folgende Fragen:

- Ist der ELISPOT-Assay eine Nachweismethode, um VZV-spezifische T-Zellen bei Zoster-Patienten zu messen?
- Kann ein Abfall der spezifischen zellulären Immunität bei Zoster-Patienten mittels ELISPOT-Assay gemessen werden?
- Welche Prädispositionen finden sich bei Patienten für die Manifestation eines Herpes Zoster, durch die Analyse des Krankheitsprofils, laborchemischer (Immunstatus, Blutbild, Serologie) und in vivo (ELISOPT-Assay) erhobener Labordaten?
- Können hieraus Schlüsse für die Ursache der Reaktivierung des Varicella-Zoster Virus gezogen werden?
- Wie kann die hier angewandte Analyse verbessert oder vereinfacht werden?

Kapitel 2

Material und Methodik

2.1 Untersuchungsprogramm

Um die zelluläre Immunität bei Patienten mit Zoster im Vergleich zu alters- und geschlechtsangepassten VZV-seropositiven Trägern zu untersuchen, wurden anamnestische und klinische Daten erhoben. Weiterhin wurden hämatologische, serologische und immunologische Parameter der allgemeinen Immunität und die spezifische Immunität bestimmt.

Die Ethikkommission der Universität Rostock bestätigte am 19.07.2006, dass gegen diese Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken bestehen. Die Studie ist unter Reg.-Nr.: A20/2006 bei der Ärztekammer Mecklenburg-Vorpommern angezeigt.

Die Patienten wurden nach einer Aufklärung und schriftlicher Patienteneinwilligung zu drei klinischen Zeitpunkten untersucht. In die Studie wurden Patienten mit einem akuten Zoster und mit Bläscheneruption (nicht älter als ca. 1-3 Tage nach Manifestation der Krankheit) aufgenommen. Diese wurden aus dem stationären Patientenkontingent der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität Rostock akquiriert. Dieser Zeitpunkt wird als akut bezeichnet. Bei den VZV-seropositiven Trägern (Kontrollgruppe) wurden die ersten Untersuchungen analog zu einem beliebig gewählten Zeitpunkt durchgeführt. Dieser Zeitpunkt wird ebenfalls als akut bezeichnet. Weitere Konsultationen erfolgten nach vier Wochen und bei ausgewählten Patienten nach sechs Monaten (Abb.2.1).

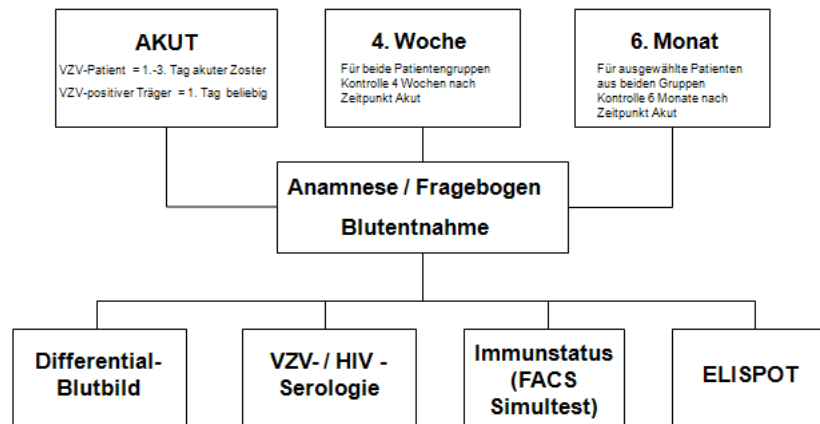


Abbildung 2.1: **Übersicht über den Aufbau des Untersuchungsprogramms.** Der Zeitpunkt "Akut" entspricht dabei immer für die VZV-seropositiven Trägern dem 1.beliebigen Tag. HIV = human immunodeficiency virus.

Parallel erfolgte ein Aktenstudium über Zoster-Patienten, die im Jahre 2006 und 2007 ambulant oder stationär in der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität Rostock behandelt wurden.

Bei einigen zufällig ausgewählten Zosterpatienten erfolgte zusätzlich eine VZV-Gentypisierung, welche im Rahmen einer wissenschaftlichen Arbeit mit anderen Zosterpatienten aus ganz Deutschland von Schmidt-Chanasit et. al. durchgeführt und veröffentlicht wurden (Schmidt-Chanasit et al., 2008, 2007). Die Daten werden im Anhang unter 6.3. dargestellt.

2.1.1 Studienpatienten

Die untersuchten Studienpatienten umfasste weibliche und männliche Patienten mit akutem Herpes Zoster, sowie weibliche und männliche VZV-seropositive Träger als Kontrollgruppe. Die Patienten stammten vorwiegend aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität Rostock. Eingeschlossen wurden Patienten, die älter als 18 Jahre waren und keine neoplastischen Erkrankungen, Autoimmun-, demyelinisierende- oder entzündliche Erkrankungen zeigten. Außerdem war das Ausschlusskriterium eine aktuelle Infektionskrankheiten (außer Herpes Zoster) und eine HIV-Infektion (human immunodeficiency virus). Die Patienten durften keine systemische Glukokortikoidtherapie erhalten. Der Nachweis eines akuten Herpes Zoster erfolgte mittels Serologie (Antikörper-Bestimmung) und VZV- Direktnachweis.

Die VZV-seropositiven Träger (Kontroll-Gruppe) wurden geschlechtsangepasst und mit einer maximalen Altersdifferenz von fünf Jahren zu den VZV-Patienten (Patienten mit Herpes Zoster) ausgewählt.

In das Aktenstudium wurden nach Aktenlage weibliche und männliche Patienten, die im Jahre 2006 und 2007 mit einem akuten Zoster behandelt wurden, eingeschlossen. Dabei wurden Daten bei der ersten Vorstellung mit manifestem Herpes Zoster in der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität

Rostock und in der Regel nach einer Kontrolluntersuchung nach vier Wochen erhoben.

2.1.2 Anamnese und Laboruntersuchungen

Die Patienten wurden zu Beginn der Studie aufgeklärt und es wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Exemplarisch ist eine Einverständniserklärung im Anhang unter 6.1 angefügt.

Die Anamnese wurde mit standardisierten Fragebögen erhoben (Siehe Anhang 6.2). Dabei wurden die Prodromalerscheinungen (Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Fieber, andere Allgemeinbeschwerden, Parästhesien, Schmerzen, Pruritus), subjektive Erkrankungsdauer, Allgemeine Anamnese (Größe, Gewicht, Nikotin-, Alkohol-, Drogenabusus), Begleiterkrankungen und Medikamentenanamnese erfragt. Die Angabe der Schmerzen wurde subjektiv durch den Patienten auf der Visuellen-Analog-Skala (VAS) mit den Werten 1-10 eingeordnet. Die Lokalisation des Herpes Zoster wurde nach Dermatomanifestation und Seitenlokalisierung dokumentiert. Bei den Zosterpatienten wurden außerdem die Komplikationen im Zusammenhang mit der Erkrankung erfasst.

Für die Laboruntersuchungen wurden Blutproben durch Punktion einer geeigneten Vene der Cubitalregion gewonnen und unverzüglich analysiert. Es wurden 2 EDTA-Röhrchen (Ethylendiamintetraaacetat) mit jeweils 2,7 ml pro Patient abgenommen.

Aus einem EDTA-Röhrchen wurde durch das Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Rostock das Blutbild und die mikroskopische Differenzierung ermittelt. Die Bestimmung des Blutbildes erfolgte mit dem Gerät Sysmex XE-2100 (Sysmex, Deutschland) mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in Kombination mit der Mehrkanalmesstechnologie. Die Messung der Leukozyten und Retikulozyten wurde im optischen Detektorblock mit der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie unter Verwendung eines Halbleiterlasers durchgeführt. Die Erythrozyten und Thrombozyten wurden mit einem Red blood cell-Detektor (RBC-Detektor) mit hydrodynamischer Fokussierung ermittelt. Mit dem Haemoglobin-Detektor (HGB-Detektor) wurde unter Verwendung des Reagenz Sulfolyser das Hämoglobin gemessen. Sulfolyser enthält Sodium-Lauryl-Sulfat und wird deshalb auch SLS-Hämoglobinbestimmungsmethode genannt. Mittels einer Pappenheim-Färbung erfolgte die mikroskopische Differenzierung.

Mit dem Blut des zweiten EDTA-Röhrchens wurde der allgemeine Immunstatus bestimmt. Im Immunstatus werden die Absolutzahlen und die Leukozytenzahlen von Immunzellen mit der Durchflusszytometrie in Form einer FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) (Becton Dickinson Simultest, USA) durch das Institut für Immunologie, Universität Rostock ermittelt. Abb.2.2. veranschaulicht das Prinzip der FACS-Analyse.

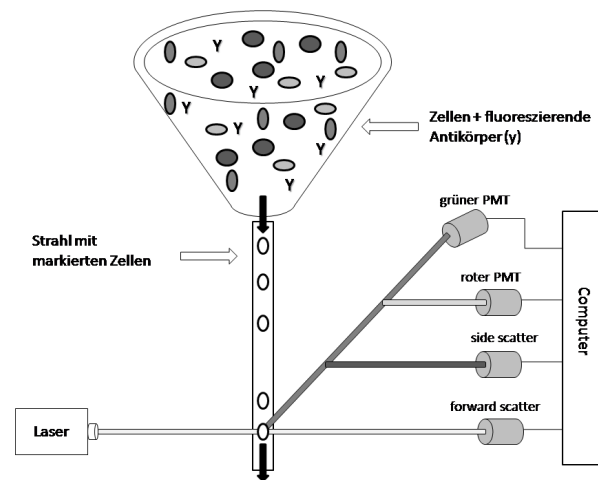


Abbildung 2.2: **FACS-Analyse.** Die zu differenzierenden Zellen werden mit fluoreszierenden Antikörpern direkt markiert und fließen dann durch einen Laserstrahl. Verschiedene Photomultiplier tubes (PMT) und scatter (forward und side) streuen das Licht. Somit kann die Größe und Granularität der Zelle an Hand der verschiedenen resultierenden Emission festgestellt werden. Die Messdaten werden mit einem Computer ausgewertet und in einem Histogramm dargestellt. Modifiziert nach Janeway et al. 2007 (Janeway et al., 2007).

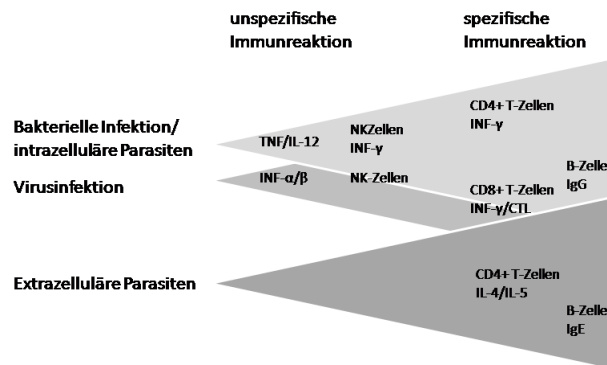


Abbildung 2.3: Immunantwort auf eine bakterielle Infektion, sowie Virusinfektion und eine Infektion mit extrazellulären Parasiten. Dabei zeigen sich deutliche Überschneidungen der viralen Infektion mit den anderen Ätiologien einer Infektion. Es zeigt sich eine Veränderung der CD8+ T-Zell, γ -Interferon und zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) Antwort. Modifiziert nach Biron et. al. (Biron et al., 2002)

Unter dem allgemeinen Immunstatus werden Zellen der spezifischen und unspezifischen Immunantwort zusammengefasst. Eine allgemeine Erläuterung zum Immunsystem und über die Funktionen der Bestandteile wurde in Kapitel 1.5. gegeben. Der allgemeine Immunstatus wurde in dieser Arbeit erhoben, um Ver-

änderungen der zellulären Abwehr bei Reaktivierung des Varicella-Zoster Virus im Vergleich zu den nicht erkrankten VZV-seropositiven Trägern zu erfassen. Die Abbildung 2.3 veranschaulicht die veränderte Immunität bei Virusinfektionen.

Die betroffenen Zellen (T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen) können mit dem Immunstatus erfasst werden. Die Detektion von γ -Interferon erfolgte spezifisch im ELISPOT-Assay.

Weiterhin wurde ein Serum-Röhrchen mit 7,5 ml venösem Blut auf Antikörper gegen das Varicella-Zoster Virus und HIV durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universität Rostock untersucht. Die VZV-spezifischen IgM und IgG wurden bei den VZV-Patienten bei jeder Untersuchung bestimmt, für die Gruppe der VZV-seropositiven Träger hingegen nur einmal. Die Antikörper Bestimmung erfolgte durch einen ELISA (SERION ELISA classic Varicella-Zoster Virus IgM/IgG). Die Patienten wurden einmal nach deren Einverständnis auf HIV getestet (HIV Ag/Ab Combo, Abbott AxSYM System).

Für die Isolierung der peripheral blood mononuclear cells (PBMC) für den ELISPOT-Assay wurden jedem Patienten 5-6 Heparin-Röhrchen mit 9 ml Blut entnommen. Die Isolierung der PBMC erfolgte mit dem Ficoll-Gradienten innerhalb der ersten vier Stunden nach der Punktion. Die Isolierung dieser Zellen wird in Kapitel 2.2.1 erläutert.

Bei den Zoster-Patienten erfolgte zum Nachweis der Erkrankung ein VZV-Direktnachweis aus einem frischen Bläschen in dem Labor der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität Rostock. Beim direkten Immunfluoreszenztest (Light diagnostics direct immunofluorescence assay Varicella-Zoster Virus, Millipore) werden vorhandene Virusantigene durch hochspezifische, monoklonale Antikörper erkannt. Acetonfixierte Abstriche aus dem Blasengrund werden auf Objektträgern mit dem VZV-Detektionsantikörper überschichtet und inkubiert. Nach einem Waschschriff mit einem Puffer werden ungebundene Antikörper entfernt. Unter dem Mikroskop sieht man bei einer Infektion der Zellen mit dem Varicella-Zoster Virus eine helle, apfelgrüne Fluoreszenz im Zellkern, Zytoplasma und/oder Zellmembran. Bei einigen Patienten erfolgte zusätzlich ein HSV-Direktnachweis aus einem Bläschen im Labor der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität Rostock (HSV1/HSV2 Collection Kit, MicroTrak PathoDx Herpes Typing Kit, remel).

Im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Virologie der Universität Frankfurt erfolgte eine VZV-Gentypisierung mittels PCR (Schmidt-Chanasit et al., 2008).

Die Tab.6.4. gibt einen Überblick über die bestimmten Laborparameter.

2.2 ELISPOT-Assay Anwendung

In Kapitel 2.2.1. wird die Gewinnung der PBMC erläutert. Danach erfolgt in Kapitel 2.2.2. die theoretische Erläuterung des ELISPOT-Assay und der MACS-Isolierung. Kapitel 2.2.3. beschreibt die praktische Durchführung des ELISPOT-Assay.

2.2.1 PBMC-Isolierung

Die für den ELISPOT-Assay benötigten PBMC wurden aus 5-6 Röhrchen Heparin-Vollblut mit dem Ficoll-Gradienten (Boyum, 1976) unter sterilen Bedingungen isoliert. Für die Blutentnahme wurden NH_4 -Heparin Röhrchen (S-Monovette) verwendet. Das unverdünnte Heparin-Vollblut eines Patienten wurde auf zwei Falcon-Röhrchen (PP-Tubes 50 ml, Fisher Scientific, Mexico) bei Zimmertemperatur (20° Celsius) pipettiert. Vorher wurden diese mit 15,5 ml Lymphoprep (1114547, LymphoprepTM, Progen, Norway) unter einer sterilen Sicherheitsarbeitswerkbank (HeraSafe, Heraeus Instruments, Germany) bestückt (Einmalpipetten PP, greiner, Germany). Das Röhrchen wurde für 20° Celsius bei 1800 U/min (400 g) für 20 Minuten zentrifugiert (CPKR Centrifuge, Beckmann, Germany). Nach der Zentrifugation wurde die PBMC-Phase, welche hauptsächlich aus Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten bestand, vorsichtig abpipettiert und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Dabei wurde es vorher mit 10 ml DPBS-Waschpuffer unter Eiskühlung bestückt. Das Röhrchen wurde auf 50 ml mit DPBS-Lösung aufgefüllt und bei 4° Celsius mit 1500 U/min (300 g) für 10 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde nach Entfernung des Überstandes auf 50 ml DPBS resuspendiert und von Zellklustern, sowie überschüssigen Proteinen über ein Zellsieb (BD Falcon Cellstrainer 40 μm Nylon, Bedford USA) separiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 4° Celsius mit 1200 U/min (200 g) für 10 Minuten und anschließend erfolgte der dritte Waschschrift des Pellet, ebenfalls mit 50 ml DPBS und Zentrifugation für weitere 10 Minuten bei 4° Celsius und 1200 U/min (200 g). Anschließend wurde das Zellpellet in 40 ml DPBS gelöst und die Zellsuspension auf eine Neubauer Zählkammer beschichtet und die Zahl der PBMC unter einem Mikroskop (Hund Wetzlar) bei 200facher Vergrößerung manuell gezählt. Während des Zählvorganges erfolgte die letzte Zentrifugation mit 1200 U/min (200 g) für 10 Minuten. Abschließend wurde das Zellpellet entsprechend einer Zellzahl von $2-4 \times 10^7$ Zellen und 1 ml Einfriermedium pro vial (Cryovial PK-100 Suport, Quebec, Canada) verteilt. Das Einfriermedium bestand aus einer 1:10 Verdünnung von fetal calf serum (FCS) („Gold“ PAA, ZAP) und Dimethyl sulfoxide, 99,9% A.C.S. (154938500ML, Sigma, Aldrich, Steinheim, Germany). Da Dimethyl sulfoxide, 99,9% A.C.S. bei Zimmertemperatur zelltoxisch ist, wurde während der gesamten Durchführung stets auf die Einhaltung von Kühlung durch Eis großen Wert gelegt. Die Vials wurden bei -70° Celsius kryokonserviert, um später für die Durchführung des ELISPOT-Assay verwendet werden zu können. Initial wurde ein Nalgene Cryo 1C Freezing Container (Nalgene, USA) verwendet, um die Zellen schonend zu konservieren. 2001 konnte die äquivalente γ -Interferon Antwort von fresh-frozen PBMC und frisch isolierten Zellen im ELISPOT Assay auf Varicella-Zoster-Virus gezeigt werden. Weiterhin wurde kein Aktivitätsverlust bei Konservierung in Trockeneis über 48 Stunden nachgewiesen (Smith et al., 2001). Andere Arbeiten zeigten auch die uneingeschränkte γ - Interferon Sekretion bei CD4^+ und CD8^+ Zellen nach Kryokonservation (Kreher et al., 2003).

2.2.2 Prinzip des ELISPOT-Assays und der MACS-Cell-Separation

Der ELISPOT-Assay ermöglicht den Nachweis antigenspezifischer T-Zellen auf Einzelzelebene, in dem das von einer T-Zelle produzierte Zytokin sichtbar gemacht wird. Auf Nitrocelluloseböden einer Mikrotiterplatte werden cytokinspezifische Antikörper beschichtet, welche sich gegen ein spezifisches, zu untersuchendes Zytokin (hier γ -Interferon) richten. Am folgenden Tag werden nicht haftende Antikörper in einem Waschschrift entfernt und gebundene monoklonale Antikörper mit Human-Serum geblockt (Vogtmann, 2005). Das in 2.2.3 vorgestellte Protokoll ist es weitgehend an die von Janetzki et al. veröffentlichte methodische Standardisierung des ELISPOT-Assays angelehnt (Janetzki et al., 2005).

In die Vertiefungen der Mikrotiter-Platte werden T-Zellpopulationen (hier CD4- und CD8-), welche vorher mit der Magnetic assisted cell sorting (MACS-Technik) separiert werden und die zu bestimmenden Antigene (hier Varicella-Zoster-Virus) zugegeben. Damit erfolgt die Stimulation der aktivierten T-Zellen direkt auf der Platte. Zusätzlich erfolgt eine Negativkontrolle (T-Zellpopulationen ohne Antigen, hier T-Zellen mit RPMI/HS 10%). RPMI steht für Roswell Park Memory Institute, welches das Zellkulturmedium auf Basis eines Hydrogencarbonat-Puffersystems entwickelte. HS ist die Abkürzung für Humanes Serum. Als weitere Negativkontrolle werden T-Zellpopulationen mit einem Kontroll-Antigen inkubiert. In dieser Arbeit werden T-Zellen mit dem Kontroll-Antigen der Firma Virion/Serion D (Würzburg, Germany) verwendet. Mit dieser Kontrolle kann überprüft werden, ob die T-Zellen eine spezifische Funktion auf das Zell-Kulturmedium besitzen, in dem das Virus an gezüchtet wurde. Bei der unspezifischen Positivkontrolle werden T-Zellen mit Lectin inkubiert, wobei hier das Lectin PHA (Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) genutzt wird. Lectine sind zuckerbindende Proteine mit der Eigenschaft, Zellen zu agglutinieren. Hier wird geprüft, ob die eingesetzten T-Zellen prinzipiell ihre Immunfunktion erhalten haben. Weitere Negativkontrollen für die verwendeten Antigene erfolgen, indem diese mit dem Medium (RPMI/HS 10% ohne Zellen) angelegt werden. Mit dieser Negativkontrolle soll ausgeschlossen werden, dass eine Antikörperseznierung nach alleinigem Kontakt mit dem Zellkulturmedium erfolgt. In einer genau einzuhaltenden Inkubationszeit von 20 Stunden findet die Antigenerkennung mit den T-Zellen statt.

Die aktivierten T-Zellen sezernieren bei Erkennung des Antigens (hier VZV-Antigen) Zytokine (hier γ -Interferon), welches an den gebundenen monoklonalen Antikörper bindet (Abb.2.4., 1). Die nicht gebundenen zellulären Bestandteile werden nun in einem Waschschrift entfernt. (Abb.2.4., 2).

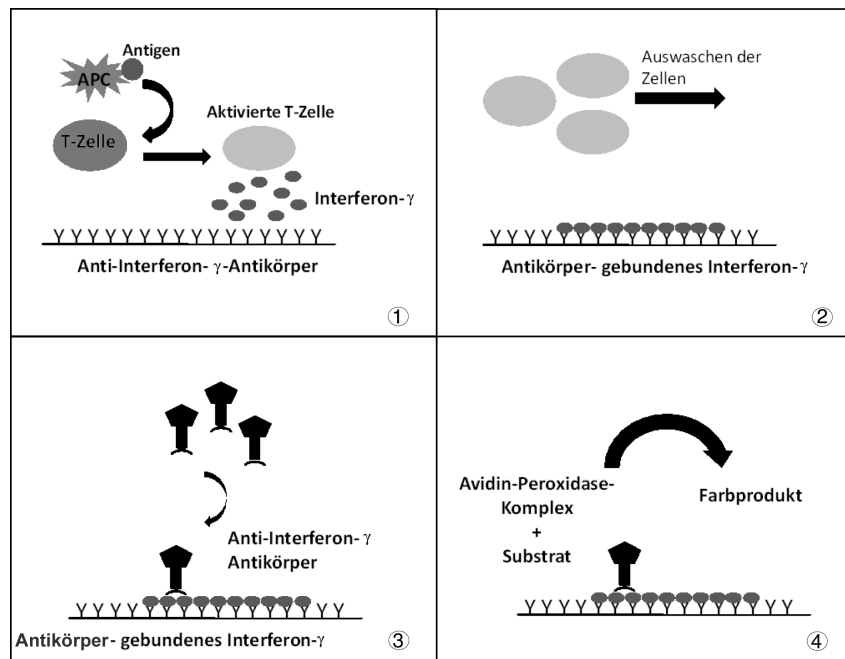
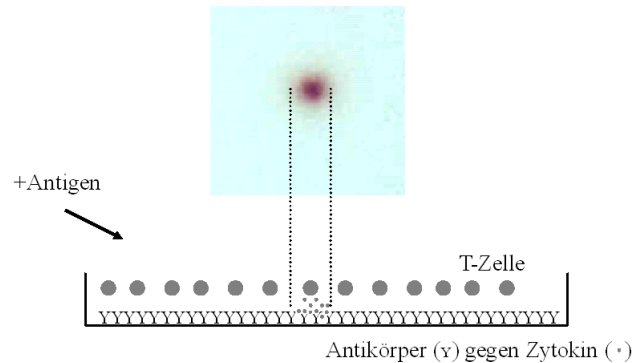


Abbildung 2.4: Prinzip des ELISPOT-Assay

1. Zytokinspezifischer Antikörper bindet an den Nitrocelluloseboden. Stimulation der T-Zellen durch Antigenpräsentierende Zellen (APC) und Antigen. Daraufhin Sekretion von Zytokinen.
2. Waschschrift.
3. Der biotinylierte Antikörper bindet an die bereits gebundenen Antikörper.
4. Indikator-Reaktion durch Enzymsubstrat.

Der Antikörper-Zytokin-Komplex wird mit einem zweiten Enzym-gekoppelten Anti-Zytokin-Antikörper gebunden (Abb. 2.4.,3) und durch spezielle Farbreaktionen durch Zugabe eines Enzymsubstrates sichtbar gemacht (Abb.2.4., 4). Dabei entsteht ein Fleck aus einem unlöslichen farbigen Präzipitat, welcher als Spot bezeichnet wird. Bei der von uns verwandten horse-radish-Peroxidase (HPRO)-Technik werden bräunlich-rote Spots erzeugt. Jeder dieser Spots repräsentiert eine spezifische T-Zelle, die mit Zytokinsekretion auf das Antigen reagiert hat, das heißt, ein Spot ist äquivalent zu einer T-Zelle (Abb.2.5). Die entstandenen Spots auf dem Boden der Mikrotiter-Platte können dauerhaft aufbewahrt werden. Sie stehen beliebig oft zu einer wiederholten Auswertung mit dem ELISPOT-Reader zur Verfügung.

ELISPOT- Assay

Abbildung 2.5: γ -Spot**MACS-Cell-Separation**

Bei der MACS-Cell-Separation können Zellen nach Bindung an magnetisch gebundene Antikörper selektiert werden (Abb.2.6.).

Die von Milteny biotec 1990 entwickelte Methode hat den Vorteil einer hohen Reinheit ($> 95\%$), hohen Gewinnrate und der schnellen Durchführbarkeit (Miltenyi et al., 1990). Die Methode der spezifischen Zell-Separation wird standardmäßig in vielen Bereichen der medizinischen Forschung angewendet (Qiu et al., 2008).

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Selektion handelt es sich um die Abreicherung (Depletion). Es werden nach der Abtrennung unmarkierte Zellen gewonnen. Hingegen werden bei der positiven Selektion markierte Zielzellen für die weitere Verwendung gewonnen.

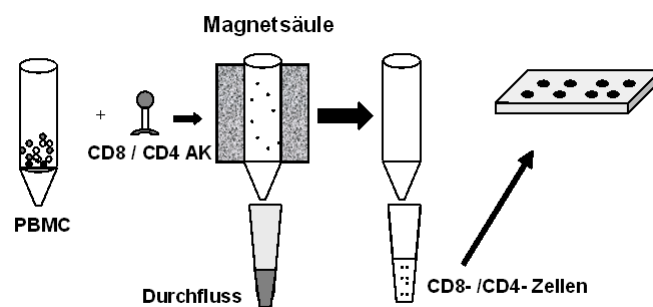


Abbildung 2.6: Prinzip MACS- Separation

Dafür werden zuerst die PBMC nach rascher Auftauung mit magnetisch markierten MACS MicroBeads inkubiert. Die MicroBeads bestehen aus Eisenoxid und einer Umhüllung aus Polysacchariden. An diese sind Antikörper (hier CD4 und CD8) gebunden. Es werden CD4- T-Zellen (entsprechen CD8+ T-Zellen)

und CD8- T-Zellen (entsprechen CD4+ T-Zellen) gewonnen. Die Zellen werden dafür nach der magnetischen Kennzeichnung über large scale (LS-Säule) gegeben, welche ferromagnetischen Kugeln enthalten und in ein magnetisches Feld des MACS-Separators eingespannt sind. Die LS-Säulen bestehen aus Plastik und können eukaryonte Zellen, Bakterien, Viren und subzelluläres Material mit einem Durchmesser kleiner als 30 μm separieren. Eine verwendete Säule besitzt die Kapazität für 1×10^8 bis 2×10^9 magnetisch markierter Zellen. Dabei werden die CD4+ und CD8+ markierten T-Zellen im Magnetfeld zurückbehalten, so dass im Durchfluss nicht markierte Ziel-Zellen (CD4- und CD8- T-Zellen) enthalten sind.

2.2.3 Praktische Durchführung des ELISPOT-Assay

Zur Herstellung des γ -Interferon-ELISPOT-Assays wurden unter sterilen Bedingungen (HeraSafe, Heraeus Instruments, Germany) in die Vertiefungen einer 96-well-Multiscreen-Platte (0,45 μm Porengröße) (Millipore MAHA S4510, Tullagreen, Ireland) in einer Verdünnung von 1:100 der Coating-Antikörper, das heißt 1 μl Anti-human IFN- γ mAb 1-D1K, purified (Mabtech, Hamburg, Germany) mit 100 μl DPBS (Lonza, Verviers, Belgium) pipettiert. Bei 4° Celsius wurden die Platten über 24 Stunden inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden nicht gebundene monoklonale Antikörper auf dem Nitrocelluloseboden der ELISPOT-Platten durch Waschpuffer entfernt. Die wells wurden drei Mal mit anschließender fünf minütiger Inkubationszeit mit je 150 μl DPBS/well gewaschen, welche mit Hilfe einer Multikanalpipette (Wheaton Acra 851, Eppendorf) aufgetragen wurde. Abschließend wurden die gebundenen Antikörper mit 150 μl RPMI/HS 10% pro well (HS = human serum) geblockt und mindestens eine Stunde bei 37° Celsius und 5% CO_2 im Brutschrank (Heraeus, Function line) inkubiert.

Parallel wurden die eingefrorenen PBMC aufgetaut und gewaschen. Die in FCS/10% DMSO konservierten Zellen wurden mit 1 ml RPMI/FCS 10% aufgenommen und in ein Röhrchen (PP-Test Tubes, 15ml, Cellstar greiner bio-one, Germany), welches mit 8 ml eisgekühltem RPMI/FCS 10% aufgefüllt wurde, überführt. Anschließend wurden die ins Medium überbrachten Zellen mit 1500 U/min (300 g) und 4° Celsius für 4 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde erneut mit 10 ml RPMI/FCS 10% gewaschen, sowie mit 1500 U/min (300 g) und 4° Celsius für 4 Minuten zentrifugiert. Nach dem zweiten Waschschrift wurde das Pellet nun mit 10 ml RPMI/FCS 10% aufgenommen und 25 μl der Zellsuspension wurden auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert, um die Zellzahl unter dem Mikroskop manuell zu bestimmen. Die verbleibende Suspension wurde vor der MACS-Zell-Isolierung mit 1500 U/min (300 g) und 4° Celsius für 4 Minuten zentrifugiert und eisgekühlt.

Für die MACS-Cell-Separation wurden die entsprechenden Zellzahlen der PBMC mit AntiCD8-Antikörper bzw. AntiCD4-Antikörper inkubiert, welche mit magnetischen MACS MicroBeads markiert sind, so dass CD4+ und CD8+ T-Zellen gewonnen werden konnten. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand genau abpipettiert und das Zellpellet mechanisch gelöst. Pro 1×10^7 Zellen wurden zuerst 20 μl MicroBeads (CD4: 5050330053, CD8: 5050419059, Miltenyi

biotec, Germany) und 80 μ l MACS-Puffer, welcher vorher steril filtriert wurde (Steritop, Vacuum Driven Disposable Bottle Top Filter, 0,22 μ m, Millipore, Schwalbach, Germany) in errechneter Menge zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation mit 4° Celsius für 15 Minuten, wobei nach der Hälfte der Zeit die Suspensionen mechanisch aufgeschüttelt wurden, um zu gewährleisten, dass möglichst viele Zellen mit dem Antikörper reagieren. Parallel dazu wurden die MACS-Separation Säulen (MACS Separation Columns LS, Miltenyi biotec, Germany 130-042-401) mit 4 ml eisgekühlten MACS-Puffer gewaschen. Die inkubierten Zellen wurden mit 4 ml MACS-Puffer aufgenommen und mit 1500 U/min (300 g) bei 4° Celsius für 5 Minuten zentrifugiert, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Nachdem der Überstand abdekantiert wurde, ist das Pellet mit 4 ml MACS-Puffer aufgenommen worden. Es wurde in die Magnetsäule pipettiert, welches mit einem Zellsieb (BD Falcon Cellstrainer 40 μ m Nylon, Bedford USA) versehen war. Nachdem die Suspension vollständig durchgelaufen war, wurde das Röhrchen mit der ehemals inkubierten MicroBeads-Zellsuspension mit 4 ml MACS-Puffer ausgespült. Dieses Volumen wurde ebenfalls über das Zellsieb und die Magnetsäule gegeben, um möglichst alle Zellen zu gewinnen. Abschließend wurde das Zellsieb verworfen und direkt 4 ml MACS-Puffer auf die Säule pipettiert. Nachdem die Zellen komplett durch die magnetischen Säulen gelaufen waren, wurden sie nun bei 1500 U/min (300 g) bei 4° Celsius über fünf Minuten zentrifugiert. Siehe auch Abb.2.7.

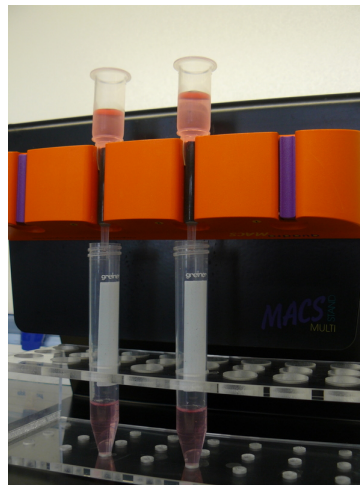


Abbildung 2.7: Foto der MACS-Cell-Separation

Der Abstand über dem Pellet wurde genau abpipettiert und in RPMI/HS 10 % gelöst. Dabei war die Größe des Pellet abzuschätzen (Volumen ca. 50 μ l) und entsprechend der erwarteten Zellzahl zu lösen. Bei sehr kleinem Pellet wurde dieses zum Beispiel in 350 μ l Medium gelöst, bei größeren Pellets konnten bis zu 950 μ l Medium verwendet werden. Als Zielgröße galt, dass die Zellen später in 50 μ l des HS-Medium pro well gelöst sein sollten. 10 μ l des Zell-RPMI/HS 10% wurden nun direkt auf die Neubauer-Zählkammer gegeben. Die tatsächlich gezählte Zellzahl der spezifischen T-Zellen, wurde später in gewünschter Zellkonzentration auf die wells aufgebracht, welche im ersten Schritt mit einem gegen

γ -Interferon gerichteten Antikörper beschichtet wurde. Es wurde eine Zellzahl von 3×10^5 /well bis max. 10×10^5 /well e der isolierten Zellen eingesetzt. Entsprechend der errechneten well-Anzahl wurden die gelösten Zellen mit RPMI/HS 10 % aufgefüllt.

Der Überstand der inkubierten Microtiterplatte wurde abgeschüttet und die Zellen (50 μ l pro well), sowie die Antigene hinzu gegeben. Als Standardansatz für ca. 10 wells wurden 20 μ l des VZV-Antigen (Serion KBR 1191, Viron/Serion D, Würzburg, Germany) mit 500 μ l RPMI/HS 10% und 5 μ l Ko-Stimulanz verwendet. Als negative Kontrolle wurden 50 μ l RPMI/HS 10% pro well inkubiert. Eine weitere negative Kontrolle stellte das Kontroll-Antigen VZV (Serion KBR 2191, Virion/Serion D, Würzburg, Germany) dar, welches ebenfalls als Standardansatz für 10 wells mit 20 μ l CAg-VZV und 500 μ l RPMI/HS 10% hergestellt wurde. Für die unspezifische positive Kontrolle mit Lectin (L4144, Lectin from Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) wurden 1 μ l PHA / well und 50 μ l RMPI/HS 10% pro well verwendet. Bei dem hier durchgeführten ELISPOT-Assay wurde eine Dreifachbestimmung der CD4+ und CD8+ Zellen mit dem Antigen, bzw. den Kontrollreihen angestrebt. Als weitere Negativ-Kontrolle wurde jedes der verwendeten Antigene einmal mit dem Medium in Reaktion gebracht. Nach Beschichtung der ELISPOT-Platte erfolgte eine Inkubation für 20 Stunden bei 37° Celsius und 5% CO₂. Siehe auch Abb.2.8 .

Die Entwicklung der Spots nach der Inkubationszeit am dritten Tag erfolgte unsteril. Die wells der ELISPOT-Platte wurden fünf Mal mit PBS/Tween 0,05% und einmal mit der Multikanalpipette (100 μ l/well) gewaschen und anschließend mit einem zweiten Antikörper beschichtet, welcher an das von den T-Zellen sezernierte γ -Interferon andockt. Anti-h-IFN- γ -mAB (7-B6-1, biotinylated, 3420-6-1000, Mabtech, Hamburg, Germany) wurde mit PBS / BSA 0,5% (BSA = Bovine Serum Albumine) in eine Verdünnung von 1:500 gebracht und davon werden 100 μ l pro well pipettiert. Danach schloss sich eine zweistündige Inkubationszeit bei 37° Celsius und 5 % CO₂ an.

Anschließend wurden die wells wie oben beschrieben mit PBS/Tween 0,05% gewaschen und mit dem Avidin-Peroxidase-Komplex, der zur Färbung der enzymgebundenen Antikörper dient, in Reaktion gebracht. Der Färbekomplex wurde aus 10 ml PBS/Tween 0,1 % und einem Tropfen Reagenz A (= Avidin DH; Elite PK 6100 Standard, Vectastain ABC Kit, Burlingame, USA) und einem Tropfen Reagenz B (= biotinylated Enzyme, Elite PK 6100, Vectastain ABC Kit, Burlingame, USA) hergestellt, welcher vor dem Verwenden 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert wurde. 100 μ l des Komplexes wurden pro well pipettiert und anschließend 1 Stunde bei 20° Celsius gelagert.

Nach dieser Inkubationszeit erfolgte ein dreimaliger Waschgang mit PBS/Tween 0,05 % und dreimalig mit PBS. Im letzten Schritt wurden 100 μ l well einer Substratlösung in jedes well der Millipore-Platte gegeben, welcher als Enzymkomplex den Avidin-Peroxidase-Komplex spaltete und den Spot darstellte. Dafür wurden 13,5 ml Aqua dest und 1,5 ml Natrium-Acetat-Lösung vermischt und 11 ml dieses Substrates zusammen mit 46,9 ml Aqua dest und 4,6 ml Essigsäure-Lösung 0,1 N gegeben. 47,5 ml dieser Lösung werden mit 2,5 ml N-N-Dimethylformamide (D4551-500ML, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) und 1 Tablette AEC (= 3-Amino-9-Ethylcarbazole Tablets; A6926-50TAB, Sigma-

Aldrich, Steinheim, Germany) aufgelöst. Abschließend wurden zu diesem Volumen 25 µl H₂O₂ 30% pipettiert und über einen 0,45 µm Spritzenfilter (Millex-HV, Millipore, Carrigtwohill, Ireland) filtriert. Nachdem die Substratlösung auf die wells pipettiert wurde, wurde nach einer Inkubationszeit von 4 Minuten unter 20° Celsius die Farbreaktion unter fließendem Leitungswasser abgestoppt und die ELISPOT-Platte in Dunkelheit getrocknet. Nun konnten die Spots ausgelesen werden.

Tabelle 6.6 im Anhang listet alle selbst hergestellten Substrate des ELISPOT-Assay mit Zusammensetzung und Herstellernachweis auf.

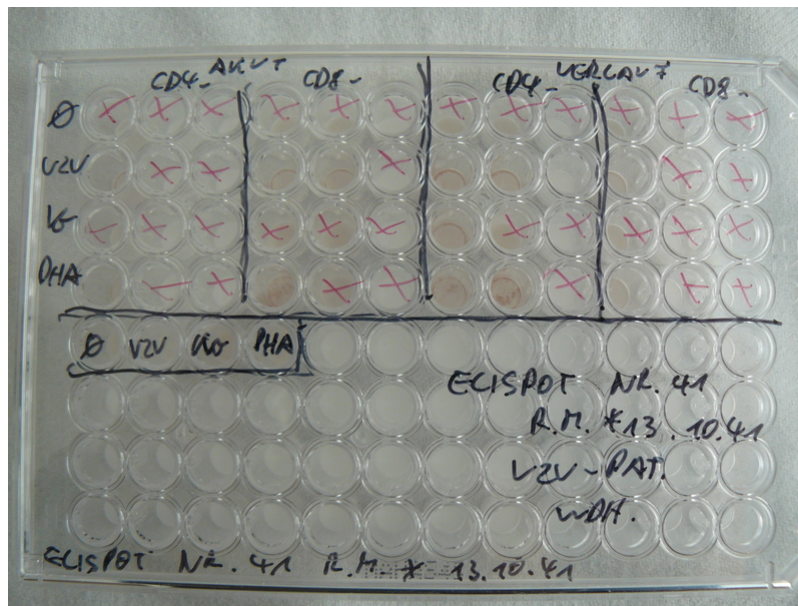


Abbildung 2.8: Beispiel einer Mikrotiterplatte mit Spots.

2.3 Auswertung des ELISPOT-Assay

Zur Auswertung der entstandenen Spots standen automatisierte Bildanalyse-systeme und die manuelle Auswertung zur Verfügung (Cui and Chang, 1997). Das hier verwendete System KS ELISPOT compact wurde 1997 von der Carl Zeiss Vision GmbH (Göttingen, Deutschland) entwickelt (Herr et al., 1997). Das System besteht aus den Komponenten Mikroskop, Kamera, Scannertisch mit Steuerung, Computer und der Analysesoftware. Siehe Abb.2.9.

Zur Auswertung wurden die ELISPOT Platten direkt in einen Halterahmen auf dem Motortisch (Märzhäuser Motortisch 112 x 102 mm) aufgebracht oder die Nitrocelluloseböden der Mikrotiterplatten direkt auf eine Klebefolie fixiert. Das KS ELISPOT System compact ist mit dem Stemi 2000 C Mikroskop und einer Farbkamera (Hitachi HV-C20A) ausgestattet, welche die Zytokin-Spots in den wells aufnehmen. Die Primäreinstellung erfolgte manuell mittels Joystick. Die Beweglichkeit bei der späteren Auswertung ist mit Hilfe einer automatischen

Steuerung und der Software möglich.



Abbildung 2.9: Foto des KS ELISPOT compact von Carl Zeiss Vision GmbH

Pro well wurde eine Auswertung in zwei Mikroskopvergrößerungen durchgeführt. Mit einem 0.65-Zoom wurde ein Bild pro well aufgenommen, wobei Spots ab einem Durchmesser von $30\text{ }\mu\text{m}$ erfasst werden konnten. Bei einem Zoom von 1.25 wurden vier Einzelaufnahmen pro well erzeugt und dann zu einem Gesamtbild zusammengefasst, wobei Spots ab einem Durchmesser von $20\text{ }\mu\text{m}$ erkannt wurden. Mit 24-Bit Farbtiefe (3x 8-Bit RGB) wurden diese digitalisiert und über die KS ELISPOT Software 4.10 ausgewertet und gespeichert.

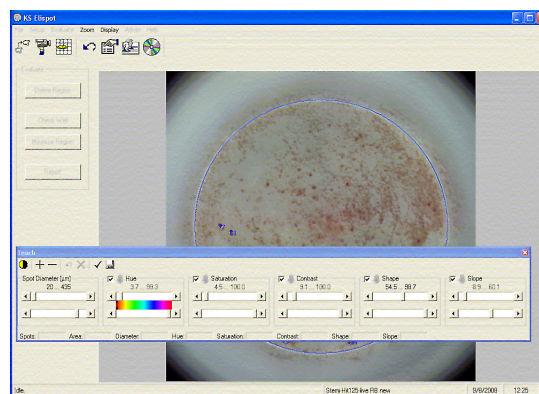


Abbildung 2.10: Screenshot der Auswertesoftware für ELISPOT-Assay

Die Auswertung der Spots mittels KS ELISPOT Software basiert auf einer Er-

kennungsroutine, die sich auf sechs wesentliche Parameter stützt. Diese bestehen aus dem Spotdurchmesser (Diameter), Farbwert (Hue), Farbsättigung (Saturation), Kontrast (Contrast), Form (Shape) und der Randsteigung/Kantensteilheit (Slope).

Dabei ist ein echter Spot ein rundes Farbareal mit am Rand fließendem Übergang zum Hintergrund und einer vom Zentrum zur Peripherie hin kontinuierlich abnehmenden Farbintensität. In Abhängigkeit von verwendeten Reagenzien können die Spots variieren, womit sich die Notwendigkeit der Anpassung der Systemparameter zur Optimierung der Erkennung ergibt. Im Rahmen eines Settings werden die oben genannten Parameter individuell auf die hier durchgeführten Proben angepasst und gespeichert. Siehe Abb.2.10.

Janetzki et al. konnten zeigen, dass die automatisierte Bildauswertung gegenüber der manuellen Auswertung (mittels Mikroskop und Auge) bezüglich der Reproduzierbarkeit und Objektivierbarkeit überlegen ist (Janetzki et al., 2004). Weiterhin ist belegt, dass computerassistent die Spots exakter zu zählen sind, als mit dem Stereomikroskop (Vaquerano et al., 1998).

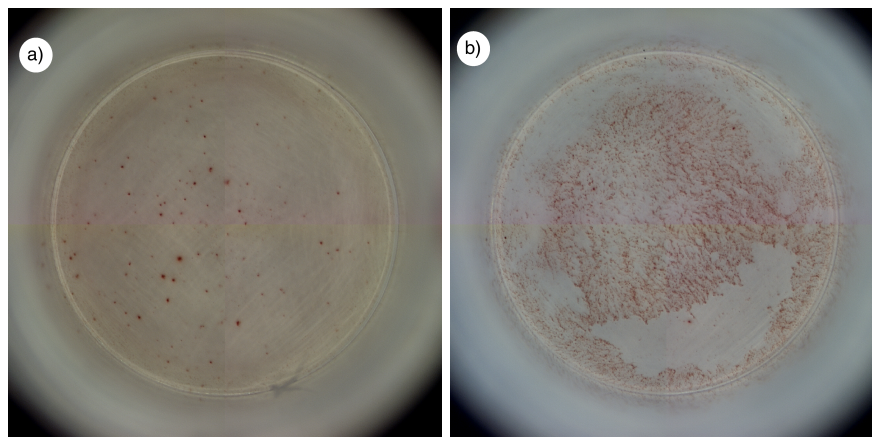


Abbildung 2.11: a) Beispielhafte Illustration typischer Spots mit maximaler Zytokinkonzentration im Zentrum.

b) Vereinzelte Spots bei ausgeprägter Schleierbildung.

Deshalb wurden in dieser Arbeit die Spots automatisch eingelesen. Daneben stehen sie als gespeicherte Bilddateien für weitere Auswertungen zur Verfügung. Die hier statistisch ausgewertete Anzahl der Spots wurde jedoch auf Basis der Einstellungen manuell ausgezählt, da sich eine mangelhafte Abgrenzung der „wahren“ zu „falschen“ Spots zeigte. Falsche Spots können als Verunreinigungen oder artifizielle Farbpunkte bezeichnet werden. Es zeigte sich bei der automatischen Auswertung ein mangelhafter Farbwert, sowie Farbsättigung und Kontrast für eine suffiziente automatische Auswertung, so dass „wahre“ Spots als diese nicht erkannt werden konnten. Dies ist mit der auffällig hohen Anzahl von Monozyten während des Infekts bei Patienten mit akutem Herpes Zoster zu begründen. Monozyten können im ELISPOT-Assay einen Art Schleier erzeugen. Zur Verdeutlichung werden in Abb.2.11. zwei Wells mit spots dargestellt.

Für weitere Informationen zu dem KS ELISPOT-Reader sei auf Malkusch et al. verwiesen (Malkusch, 2005).

2.4 Statistik

Die Ergebnisse der untersuchten Probandengruppen wurden im Vergleich zwischen den Gruppen, also Zoster-Patient versus VZV-seropositiver Träger (interindividuell), sowie innerhalb einer Probandengruppe (intraindividuell) über die drei jeweiligen Zeitpunkte ausgewertet.

Im Aktenstudium wurden die Zoster-Patienten als einzelne Gruppe dargestellt, sowie mit denen in die Studie eingeschlossenen Zoster-Patienten verglichen. Innerhalb der aktenkundigen Zoster-Patienten wurden die Daten nach vergleichenden Kriterien, wie Geschlecht (männlich und weiblich), Altersspanne (≤ 45 Jahre, 46-55 Jahre, 56-65 Jahre, 66-75 Jahre, 76-85 Jahre, ≥ 86 Jahre) und gleiche Lokalisation des Herpes Zoster weiter untersucht.

Die beschreibende und schließende Statistik wurde mittels Statistikprogramm SPSS 16.0 (Statistical Products and Service Solutions) durchgeführt, welches von N. Nie und D. Bent 1965 an der Stanford University, San Francisco entwickelt wurde. In der beschreibenden Statistik wurde der arithmetische Mittelwert ($\bar{x}$) und die Standardabweichung (STABW) errechnet und graphisch veranschaulicht.

Bei der schließenden Statistik wurden die qualitativen Merkmale mittels Chi-Quadrat-Test nach Pearson ausgewertet. Die Signifikanzen der quantitativen Merkmale wurden mit Hilfe des U-Test nach Mann, Whitney (Vergleich Zoster-Patient versus Kontroll-Gruppe) ermittelt (Mann and Whitney, 1947). Der U-Test vergleicht zwei unabhängige Stichproben auf Basis der Vergabe von Rangzahlen (Krentz, 2005). Mit dem Friedmann-Test wurde untersucht, ob es innerhalb einer Probandengruppe zwischen den Zeitpunkten (akut, nach vier Wochen, nach 6 Monaten) signifikante Unterschiede gab (abhängige Stichproben). Ergab sich eine asymptotische Signifikanz im Friedmann-Test annähernd $p \leq 0.05$ (vgl. Tab.2.1) wurden die einzelnen Merkmale paarweise mit dem Wilcoxon Test (Wilcoxon, 1945) zwischen jeweils zwei Zeitpunkten geprüft.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass auf Grund der kleinen Stichprobengröße zum dritten Meßzeitpunkt (nach sechs Monaten) statistisch keine Aussagekraft gewonnen werden kann.

Irrtumswahrscheinlichkeit	Bedeutung	Symbol
$p \geq 0.05$	nicht signifikant	ns
$p < 0.05$	signifikant	*
$p < 0.01$	sehr signifikant	**
$p < 0.001$	hoch signifikant	***

Tabelle 2.1: Signifikanzniveau (nach (Krentz, 2005))

Bei der Durchführung des ELISPOT-Assay wurde eine Dreifachbestimmung pro Antigen angestrebt, war jedoch aufgrund der niedrigen Zellzahl nicht möglich.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Darstellung der Ergebnisse

Die Übersicht zum Aktenstudium und der Untersuchungsbögen, der in die Studie eingeschlossenen Patienten, erfolgt zu Beginn (Aktenstudium in 3.2. und Untersuchungsbögen in 3.3.). Damit soll ein orientierender Überblick über die untersuchten Probanden gegeben werden. Es konnten hierbei keine Signifikanzen festgestellt werden. Die Daten werden sowohl graphisch gezeigt. Eine Zusammenfassung der Daten zum Aktenstudium findet sich im Anhang unter 6.4.1 und die der Untersuchungsbögen unter 6.4.2.

Danach erfolgt die graphische Darstellung der signifikanten Labordaten (Blutbilder in 3.4., Lymphozytenstatus in 3.5., Serologie in 3.6.) und die ermittelten Spots durch den ELISPOT-Assay (in 3.7.).

Beim Vergleich zwischen den Probandengruppen (interindividuell) werden zuerst die Zoster-Patienten (Zoster) und dann die VZV-seropositiven Träger, welche zur einfachen Nennung als Kontroll-Patient (Kontroll) ausgewiesen werden, in einer Graphik vorgestellt. Die komplett erhobenen Labordaten im Anhang unter 6.4.2 - 6.4.7 tabellarisch gezeigt.

Beim zeitlichen Verlauf innerhalb einer Gruppe (intraindividuell) erfolgt die Illustration getrennt nach der Gruppe, wobei auch hier primär die Ergebnisse der Zoster-Patienten gezeigt werden. Die Graphiken zeigen die Veränderungen in der Zeitachse bei akut (akuter Zosterbeginn) bzw. x0 (beliebiger Zeitpunkt), nach vier Wochen und nach sechs Monaten.

Die Ergebnisse der signifikanten Messwerte werden durch ein Balkendiagramm mit dem jeweiligen arithmetischen Mittelwert (Angabe als Wert gerundet auf eine Dezimalstelle) und dem positiven Fehlerindikator veranschaulicht. Das Signifikanzniveau wird im Text aufgezeigt. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen erstem und zweitem Zeitpunkt, wurde mit Pfeilen in der Graphik veranschaulicht.

Die Anzahl der in die Statistik eingegangenen Werte der Probanden ist mit "n" unterhalb der Probandengruppe zum jeweiligen Zeitpunkt aufgeführt. Es fällt auf, dass gerade bei den Subpopulationen der Lymphozyten und auch der Blutbilder die Anzahl der Werte oft kleiner als 22 ist. Obwohl die Patienten wie in

Kapitel 2.1. beschrieben wurde, untersucht worden sind. Diese Defizite kommen durch labortechnische Probleme und darauf folgende fehlende Bereitschaft der Patienten zu einer weiteren Blutentnahme zu Stande. Mangelnde Teilnahmebereitschaft war auch ein Grund für die geringe Anzahl der Kontroll-Patienten und in beiden Gruppen Teilnehmende zum dritten Untersuchungszeitpunkt nach sechs Monaten. Weiterhin werden Werte größer als $n=22$ bei der Auswertung des ELISPOT-Assays auf Grund der maximalen Dreifachbestimmung der Antigene pro Patient erzeugt.

Bei der Auswertung der Blutbilder konnten Signifikanzen zwischen den Geschlechtern innerhalb der vergleichenden Gruppen festgestellt werden. Da diese geschlechtsspezifischen Unterschiede allgemein bekannt sind und sie für diese Untersuchung keine Wertigkeit besitzen, werden sie nur tabellarisch aufgeführt und finden keine weitere Erläuterungen.

Die Ergebnisse, insbesondere der Immunstatus und die Daten zum ELISPOT-Assay, wurden teilweise auf der

- XXXV. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung e.V. (28.02.-01.03.2008 in Erlangen) S.G.Schaed (2008),
- bei der 21. Jahrestagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (09.10.-11.10.2008 in Bonn) R. Baukholt (2008),
- sowie auf der 46. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (30.03.-02.04.2011 in Dresden) Schaed S.G (2011) veröffentlicht.

Nach praktischem Abschluss dieser Dissertation wurde für den Förderzeitraum von 2008-2011 unter dem FORUN-Antrag Nr. 889038 unter dem FORUN-Förderzweig Anschub interne Forschungsmittel der medizinischen Fakultät der Universität Rostock auf Grund der hier vorliegenden Daten bewilligt.

3.2 Aktenstudium

Beim Aktenstudium der Zoster-Patienten, welche in der Klinik für Dermatologie und Venerologie vorstellig wurden, konnten keine Signifikanzen im Vergleich der Patienten nach dem Jahr der Erkrankung (2006 und 2007), sowie zwischen den Zoster-Patienten und den Studien-Patienten gemessen werden.

Es erfolgt hier keine Darstellung getrennt nach den Jahren 2006 und 2007, sondern die erfassten Patienten werden zusammen dargestellt. Im Jahr 2006 wurden während der Durchführung der Studie nach Aktenlage 82 Patienten und im Jahr 2007 24 Patienten erfasst, insgesamt also 106 Patienten, davon waren 22 Patienten Studienpatienten.

Zuerst werden graphisch das Alter, Geschlecht, das betroffene Dermatom, die Anzahl der betroffenen Dermatome und der Schmerzverlauf gezeigt.

In Anhang 6.4.1 werden die nicht illustrierten, im Rahmen des Aktenstudiums ermittelten Werte als Zusammenfassung tabellarisch aufgeführt.

Abb.3.1. illustriert die Vollständigkeit der Datenerfassung für die Patienten mit einem Herpes Zoster nach Aktenlage. Anzumerken ist, dass nicht alle Daten, besonders die Labordiagnostik bei jedem Patienten retrospektiv an Hand der

Akten ermittelt werden konnten.

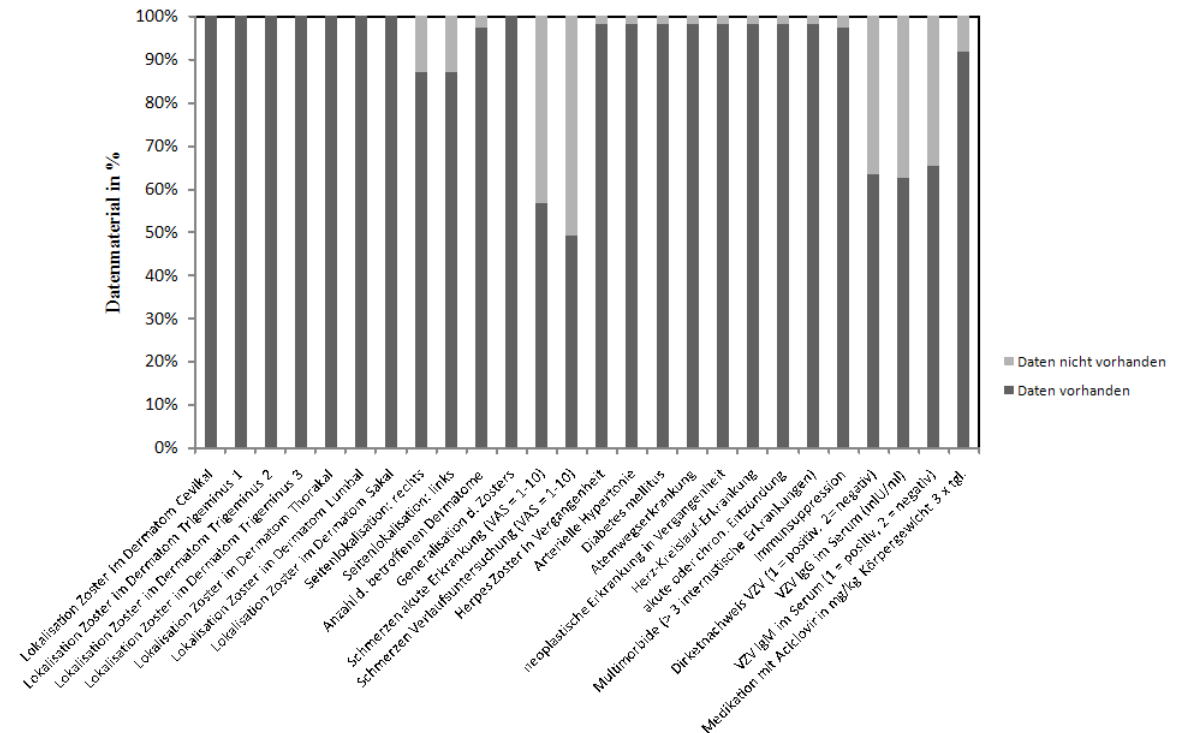


Abbildung 3.1: Datenverfügbarkeit zusammengefasst für das Jahr 2006 und 2007 beim Aktenstudium.

3.2.1 Altersklassen und Geschlecht

Die Patienten waren im Mittelwert 64,65 Jahre alt. Der jüngste Patient war 17 Jahre alt und der älteste Patient 91 Jahre alt. In der folgenden Graphik werden die Patienten in Altersklassen unterteilt (Abb. 3.2.). Dabei wurden sie in folgende Altersklassen gegliedert: ≤ 45 Jahren, 46-55 Jahren, 56-65 Jahren, 66-75 Jahren, 75-85 Jahren, ≥ 86 Jahren.

Bei den Patienten des Aktenstudiums waren 15 Patienten ≤ 45 Jahre alt, 10 Patienten zwischen 46-55 Jahre alt, 11 Patienten 56-65 Jahre alt, 19 Patienten 66-75 Jahre alt, 22 Patienten 75-85 Jahre alt und 7 Patienten waren ≥ 86 Jahre alt.

Bei den Studienpatienten war 1 Patienten ≤ 45 Jahre alt, 3 Patienten zwischen 46-55 Jahre alt, 5 Patienten 56-65 Jahre alt, 6 Patienten 66-75 Jahre alt, 6 Patienten 75-85 Jahre alt und 1 Patient war ≥ 86 Jahre alt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studienpatienten und allen an Zoster erkrankten Patienten gemessen werden.

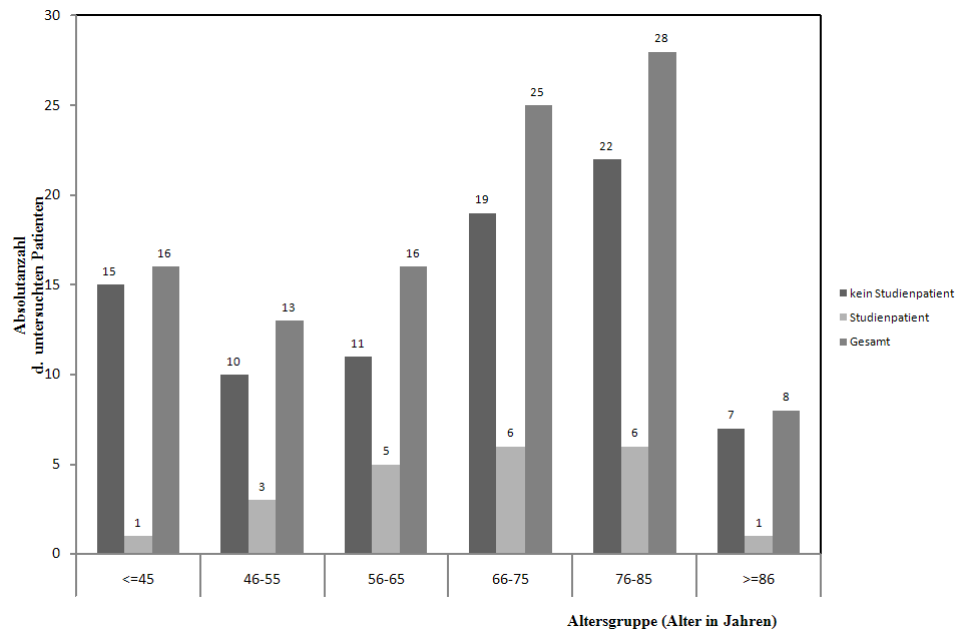


Abbildung 3.2: **Altersklassen nach Patienten, die im Aktenstudium erfasst wurden im Vergleich zu Studienpatienten.**

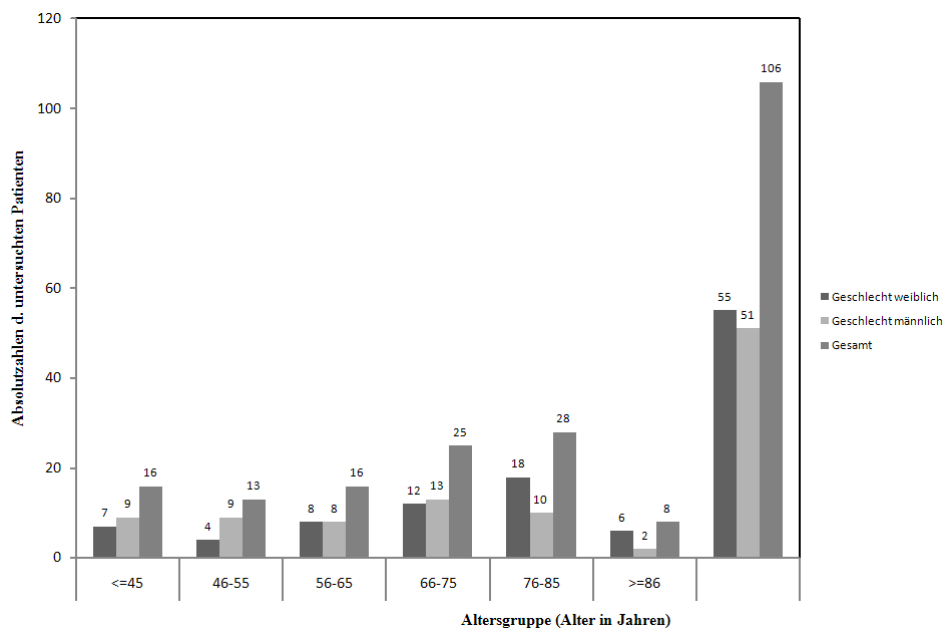


Abbildung 3.3: **Geschlecht innerhalb der Altersklassen.** Die Abbildung zeigt die Absolutzahlen analog zu den o.g. Altersklassen unterteilt nach dem Geschlecht.

Eine weitere Abbildung (Abb.3.3.). gibt die Geschlechtsverteilung innerhalb

der untersuchten Altersgruppen wieder. Insgesamt wurden 55 weibliche und 51 männliche Patienten untersucht. Im Jahr 2006 waren von 82 Patienten 45 weiblich und 37 männlich. Im Jahr 2007 wurden während des Zeitraumes der Studie 24 Zoster-Patienten betreut, wovon 10 weiblich und 14 männlich waren. Bei den Patienten waren 7 Frauen und 9 Männer ≤ 45 Jahre alt, 4 Frauen und 9 Männer waren zwischen 46-55 Jahre alt, 8 Frauen und 8 Männer waren zwischen 56-65 Jahre alt, 12 Frauen und 13 Männer waren zwischen 66-75 Jahre alt, 18 Frauen und 10 Männer waren zwischen 75-85 Jahre alt und 6 Frauen und 2 Männer waren ≥ 86 Jahre alt.

3.2.2 Dermatome

In den beiden untersuchten Jahren wurde eine Erkrankung im Dermatome Trigemini 1 bei 39,5% (n=49) aller Patienten diagnostiziert. Das Dermatome Trigemini 2 war bei 4% (n=5) und das Dermatome Trigemini 3 war bei 1,6% (n=2) aller Patienten betroffen. Der Zoster zeigte sich bei 10,5% (n=13) aller Patienten in den cervikalen Dermatomen. In den thorakalen Dermatomen waren 26,6% (n=33) aller Patienten erkrankt. Ein Herpes Zoster wurde bei 12,1% (n=15) aller Patienten in den lumbalen Dermatomen erhoben. Bei 5,6% (n=7) aller Patienten fand eine kutane Reaktivierung des VZV-Virus in den sakralen Dermatomen statt. Ein Patient hatte ein Zoster sine herpete (graphisch nicht dargestellt). Graphisch sind die Werte der Abb.3.4. zu entnehmen. Anzumerken ist, dass mehr als ein Dermatome bei einer akuten Zostererkrankung betroffen sein kann. Daher ist die Absolutzahl der betroffenen Dermatome n=124 bei insgesamt 106 Patienten nach Aktenstudium. Siehe auch folgende Abb.3.6.

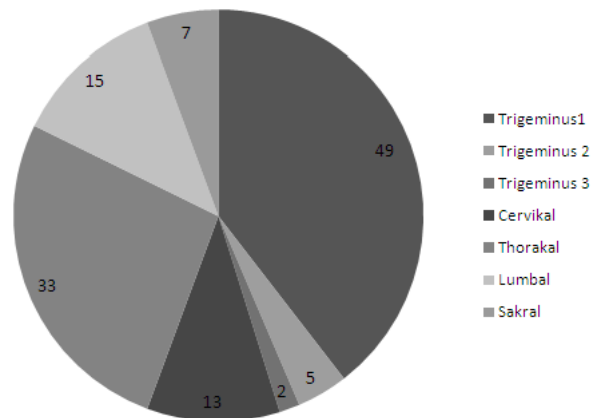


Abbildung 3.4: **Betroffene Dermatome.** Angabe der betroffenen Dermatome in Absolutzahlen.

In der Abb.3.5. werden die betroffenen Dermatome zusammen für das Jahr 2006 und das Jahr 2007 getrennt nach dem Geschlecht aufgezeigt. Das Dermatome Trigemini 1 war bei 17,7% (n=22) aller Frauen und 21,8% (n=27) aller Männer betroffen (insgesamt Frauen und Männer n=49). Im Dermatome Trigemini 2

waren 1,6% (n=2) aller Frauen und 2,4% (n=3) aller Männer erkrankt (insgesamt Frauen und Männer n=5). Eine Manifestation im Dermatome Trigeminus 3 war bei keiner (n=0) Frau und bei 1,6% (n=2) aller Männer zu erheben (insgesamt Frauen und Männer n=2). In den cervikalen Dermatome fand sich ein Herpes Zoster bei 6,5% (n=8) aller Frauen und 4,0% (n=5) aller Männer (insgesamt Frauen und Männer n=13). In den thorakalen Dermatome zeigte sich bei 14,5% (n=18) aller Frauen und 12,1% (n=15) aller Männer eine Zostererkrankung (insgesamt Frauen und Männer n=33). Die lumbalen Dermatome waren bei 7,3% (n=9) aller Frauen und 4,8% (n=6) aller Männer betroffen (insgesamt Frauen und Männer n=15). Eine kutane Reaktivierung fand in den sakralen Dermatomen bei 3,2% (n=4) aller Frauen und 2,4% (n=3) aller Männer statt (insgesamt Frauen und Männer n=7). Es waren keine Signifikanzen zwischen den Geschlechtern bzgl. eines betroffenen Dermatome messbar.

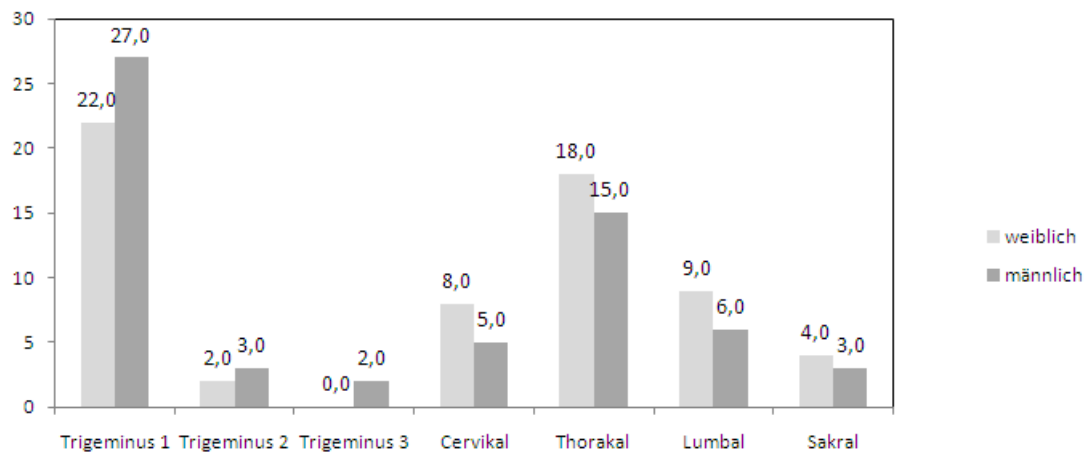


Abbildung 3.5: **Betroffene Dermatome nach dem Geschlecht.** Angabe der betroffenen Dermatome in Absolutzahlen.

Die Analyse der Anzahl der betroffenen Dermatome ergab, dass bei 106 Patienten insgesamt 124 Dermatome betroffen waren (da bei einem Patienten mehrere Dermatome betroffen sein können). Die drei Äste des N. trigeminus (V1-V3) wurden jeweils als einzelnes Dermatome gezählt. Waren jedoch z.B. C1-C3 betroffen, wurden diese als ein Dermatome benannt. Diese Auswertung wurde vorgenommen, da in den Akten nicht alle betroffenen Dermatome genau benannt wurden (z.B. nur Thorakal, exakt wäre jedoch z.B. Th8). So fehlte weiterhin auch häufig die Seitenangabe der Lokalisation.

Ein Patient (0,9%) litt unter einem Zoster sine herpette. Bei 88 Patienten (83,0%) war ein Dermatome betroffen. Bei 16 Patienten (15,1%) wurde eine Zostererkrankung in zwei Dermatome diagnostiziert. Bei einem Patienten (0,9%) wurde eine Manifestation in vier Dermatomen dokumentiert. Bei 14 Patienten (13,2%) wurde in den Akten eine Generalisation notiert (graphisch nicht dargestellt). Die Abb.3.6. zeigt absolut die Häufigkeit der betroffenen Dermatome. .

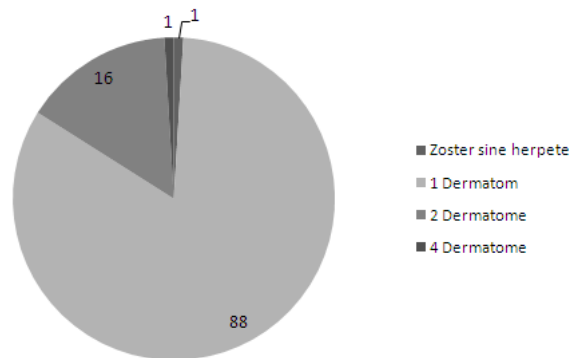


Abbildung 3.6: **Anzahl der betroffenen Dermatome.** Angabe in Absolutzahlen

3.2.3 Schmerzskala

Zeitpunkt Akut Die Abb.3.7. veranschaulicht die erhobenen Daten zur Angabe der Schmerzen bei akutem Herpes Zoster auf der Visuelle-Analog-Skala (VAS). Nach Aktenlage konnten retrospektiv für 60 Patienten (56,6% aller untersuchten Patienten mit akutem Zoster) Messwerte erhoben werden. Wie in Abb. 3.1. dargelegt, konnten bei fehlender Angabe in den Krankenakten nicht alle Schmerzverläufe ermittelt werden.

Werden die einzelnen Stufen der VAS betrachtet, waren 13 Patienten schmerzfrei (VAS = 0), was einem Anteil von 21,7% entspricht. 4 Patienten (6,7%) gaben Schmerzen der VAS 1 an, 5 Patienten (8,3%) benannten den Schmerz auf der VAS mit 2 und auf der VAS 3 ordneten sich 2 Patienten (3,3%) ein. Den akuten Zosterschmerz betitelten 4 Patienten (6,7%) mit VAS 4. 8 Patienten (13,3%) fanden sich auf der VAS 5, 4 Zosterpatienten (6,7%) auf der VAS 6 und 7 Patienten (11,7%) auf der VAS 7 wieder. Starke Schmerzen mit der VAS 8 gaben 6 Patienten (10%) an, 3 Patienten (5%) ordneten ihren subjektiv empfundenen Schmerz auf der VAS 9 und 4 Patienten (6,7%) auf der VAS 10 ein.

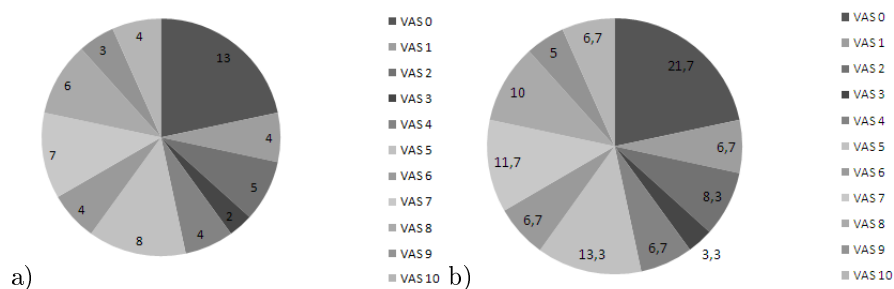


Abbildung 3.7: **Schmerzskala zum Zeitpunkt akut.** VAS = Visuelle-Analog-Skala (0-10). a) Angabe in Absolutzahlen und b) in Prozent.

Zeitpunkt nach vier Wochen

Bei der Wiedervorstellung in der Klinik für Dermatologie und Venerologie

konnte bei 52 Patienten nach Aktenlage die Schmerzskala nach vier Wochen ermittelt werden. Von diesen Patienten gaben 36 Patienten (69,2%) Schmerzfreiheit (VAS = 0) an. 1 Patient (1,9%) bezifferte die Schmerzen auf der VAS mit 1/10, 4 Patienten (7,7%) gaben ihr Schmerzempfinden mit VAS 2 an, 1 Patient (1,9%) mit VAS 3 und 3 Patienten (5,8%) mit VAS 4. Auf der VAS 5 fanden sich 2 Patienten (3,8%) wieder, auf der VAS 6 3 Patienten (5,8%) und auf der VAS 7 kein Patient. Ein Patient (1,9%) ordnete seinen Schmerz auf der VAS 8 ein, kein Patient auf der VAS 9 und ein Patient auf der VAS 10 (1,9%). Die Absolut- und Prozentzahlen sind der Abb.3.8. zu entnehmen.

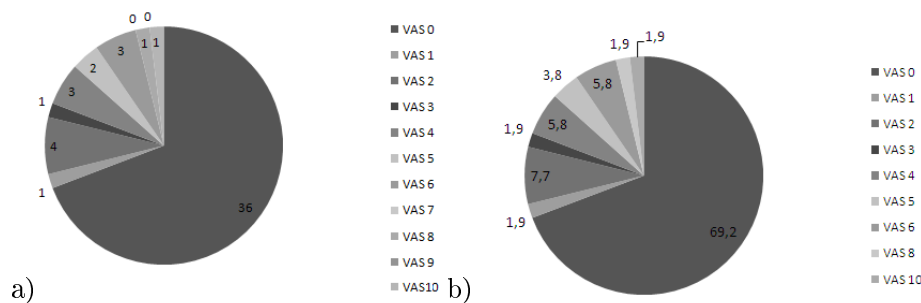


Abbildung 3.8: **Schmerzskala zum Zeitpunkt nach vier Wochen.** VAS = Visuelle-Analog-Skala (0-10). a) Angabe in Absolutzahlen und b) in Prozent.

3.3 Untersuchungsbögen

Es wurden 22 Patienten (9 weibliche und 13 männliche Patienten) mit akutem Herpes Zoster in der Studie untersucht. Als Kontrollgruppe wurden 18 VZV-seropositive Träger (8 weibliche und 10 männliche Patienten) eingeschlossen. Die Zoster-Patienten wurden aus den 106 Patienten, die mit einem Herpes Zoster, die in der Klinik für Venerologie und Dermatologie vorstellig wurden, akquiriert. Insgesamt wurden von den 106 Patienten (Aktenstudium) 22 Patienten in die Studie eingeschlossen. Bei diesen 22 Zoster-Patienten erfolgten die in Kapitel 2.1.2. genannten Untersuchungen zum Zeitpunkt akut, bei 21 Patienten nach vier Wochen und bei 6 Patienten nach sechs Monaten. Der ELISPOT wurde für die genannten Zeitpunkte einmal durchgeführt und bei 5 dieser Patienten als Wiederholung zum Nachweis der Reproduzierbarkeit zwei Mal.

Bei den 18 VZV-seropositiven Trägern erfolgten die Untersuchungen zum Zeitpunkt x0 (beliebiger Zeitpunkt der 1. Untersuchung), bei 17 Patienten nach vier Wochen und bei 3 Patienten nach sechs Monaten. In dieser Patientengruppe wurde der ELISPOT bei 18 Patienten einmal und bei 3 Patienten zwei Mal (als Wiederholung) durchgeführt.

Im arithmetischen Mittelwert lag das Alter der Zoster-Patienten bei 67,7 Jahren und der VZV-seropositiven Träger bei 68,3 Jahren.

In den Untersuchungsbögen wurden subjektive Merkmale (z.B. Parästhesien, Schmerzen) und die Anamnese der in die Studie eingeschlossenen Patienten mit Herpes Zoster und VZV-seropositive Träger (Kontroll-Patienten) erhoben. Im Anhang sind in der Tab.6.10. und der Tab.6.11. nur Merkmale dargestellt, die bei einer der untersuchten Probandengruppe oder bei beiden Probandengrup-

pen vorhanden waren. Die Untersuchungsbögen sind in Kapitel 6.2. exemplarisch dargestellt.

3.4 Blutbild und mikroskopische Differenzierung

An dieser Stelle sei auf Tabelle 6.25. im Anhang hingewiesen. Dort werden die für diese Arbeit verwendeten laborspezifischen Laborwerte des Blutbildes und der mikroskopischen Differenzierung gegeben. Weiter findet sich im Anhang unter 6.4.3 eine Zusammenfassung aller erhobenen Daten zum Blutbild, sowie mikroskopische Differenzierung und unter 6.3.3 die tabellarische Auflistung der signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede innerhalb der Probandengruppen.

3.4.1 Lymphozyten

Vergleich innerhalb der Probandengruppe

Bei den Zoster-Patienten war ein signifikanter Unterschied mit $p=0.046$ zwischen dem akuten Zoster-Beginn und der Verlaufskontrolle nach sechs Monaten messbar. Abb.3.9. demonstriert den zeitlichen Verlauf. Zu den ersten beiden Messzeitpunkten konnten mit $21,9 \pm 15,2\%$ bei Zoster akut und nach vier Wochen mit $22,3 \pm 12,1\%$ nahezu identische Werte ermittelt werden. Bei Betrachtung der letzten Messung nach sechs Monaten ist ein prozentualer Anstieg der Lymphozytenzahl auf $28,0 \pm 13,4\%$ zu beobachten. Die gemessenen Zellzahlen lagen alle im Normbereich (20-42%).

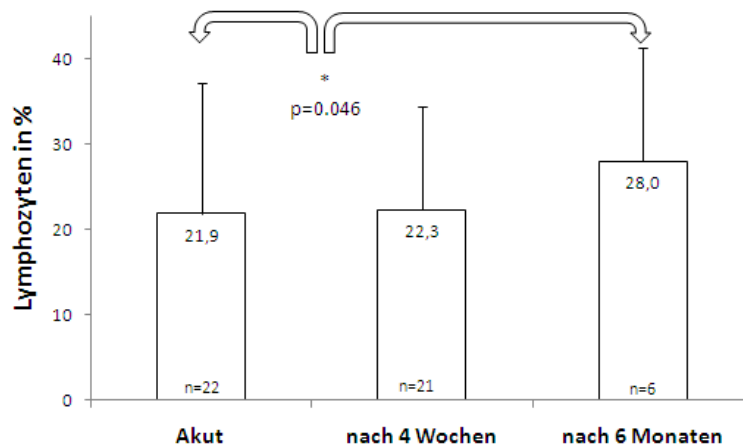


Abbildung 3.9: **Zoster-Patient.** Im zeitlichen Verlauf zeigte sich ein signifikanter Anstieg zwischen dem ersten und letzten Messpunkt.

3.4.2 Thrombozyten

Vergleich innerhalb der Probandengruppe

Die untersuchten Zoster-Patienten zeigten zwischen der ersten und zweiten

Messung einen hoch signifikanten ($p=0.001$) Anstieg der Thrombozyten. Zum akuten Zosterbeginn wurde ein Wert von $207,1 \pm 79,1 \times 10^9/l$ gemessen, nach vier Wochen lag dieser bei $282,2 \pm 124,5 \times 10^9/l$ (Abb.3.10.). Im Verlauf zum Zeitpunkt nach sechs Monaten sank die Zellzahl auf $237,0 \pm 79,2 \times 10^9/l$ und lag damit weiter erhöht gegenüber dem akuten Krankheitsbeginn. Alle gemessenen Werte der Zoster-Patienten lagen innerhalb der Normwerte ($150-450 \times 10^9/l$).

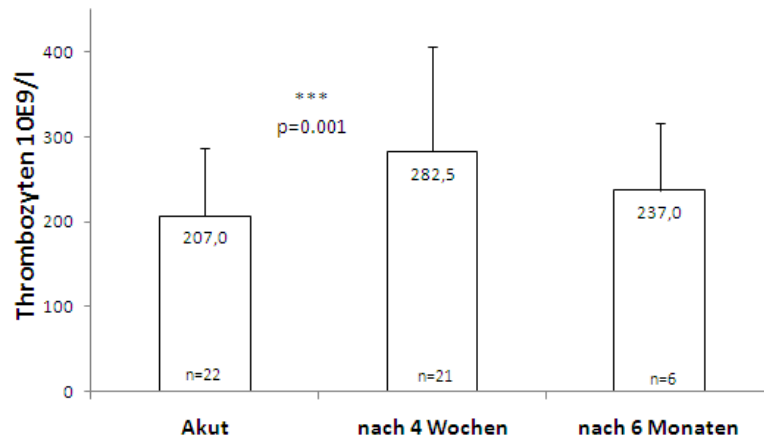


Abbildung 3.10: **Zoster-Patient.** Es konnte eine hoch signifikante Erhöhung dieser Zellpopulation zwischen der akuten Erkrankung und der ersten Verlaufsuntersuchung eruiert werden.

3.4.3 Eosinophile Granulozyten

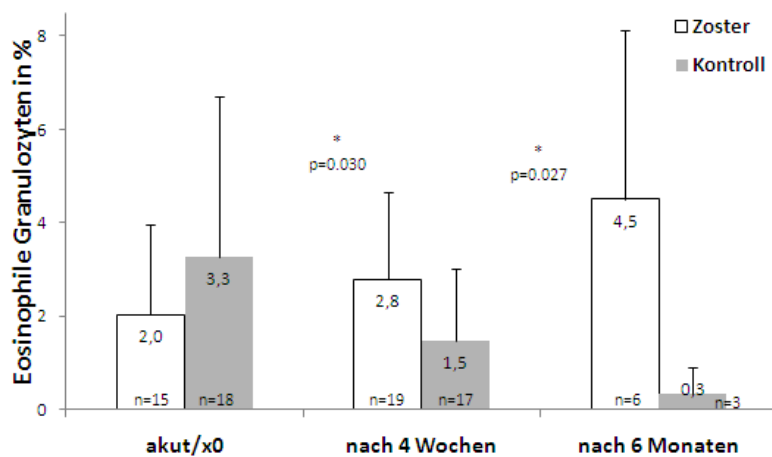


Abbildung 3.11: **Prozentualer Anteil der eosinophilen Granulozyten der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.**

Vergleich Zoster-Patient versus VZV-seropositiver Träger Zum ersten Untersuchungszeitpunkt betrugen die Zellzahlen bei den Zoster-Patienten $2,0 \pm 1,9\%$ und bei den Kontrollpersonen $3,3 \pm 3,4\%$ ($p=0.362$). Es konnte eine signifikante ($p=0.030$) Erhöhung des prozentualen Anteils der eosinophilen Granulozyten bei den Zoster-Patienten mit $2,8 \pm 1,9\%$ gegenüber der Kontroll-Gruppe mit $1,5 \pm 1,6\%$ zum Untersuchungszeitpunkt nach vier Wochen festgestellt werden. Auch zum dritten Untersuchungszeitpunkt nach sechs Monaten wurde ein signifikanter ($p=0.027$) Unterschied zwischen den Gruppen gemessen. Der prozentuale Anteil der eosinophilen Granulozyten stieg bei den Zoster-Patienten auf $4,5 \pm 3,6\%$ und sank bei den VZV-seropositiven Trägern auf $0,3 \pm 0,6\%$ (Abb.3.11.).

Damit lagen die gemessenen Werte zu allen Zeitpunkten bei allen Patienten innerhalb der Normwerte $<5\%$.

Vergleich innerhalb der Probandengruppe

Für die Kontrollgruppe der VZV-seropositiven Träger ergab sich im zeitlichen Verlauf ein signifikanter Unterschied beim Vergleich zwischen den Zeitpunkten x0 ($3,3 \pm 3,4\%$) und der Untersuchung nach vier Wochen ($1,5 \pm 1,6\%$) mit $p=0.023$ (Abb.3.12.). Im Vergleich zum Zeitpunkt nach sechs Monaten $0,3 \pm 0,6\%$ war keine Signifikanz messbar. Es wurden keine Abweichung von den Normwerten ($<5\%$) festgestellt.

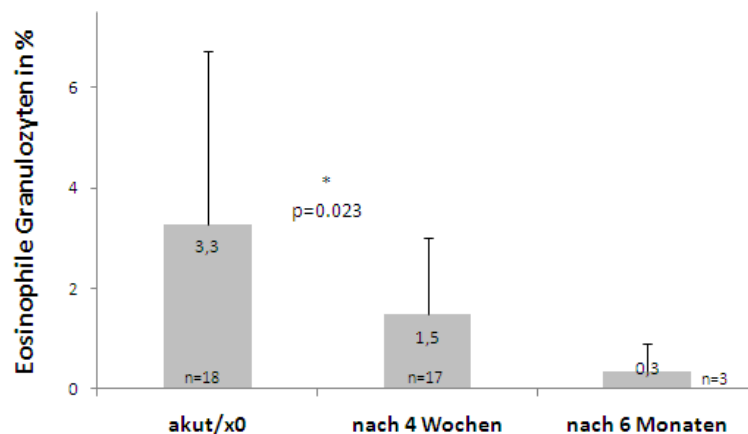


Abbildung 3.12: **Kontroll-Gruppe.** Im zeitlichen Verlauf zeigt sich eine Senkung des prozentualen Anteils der eosinophilen Granulozyten, welche zwischen den ersten beiden Messpunkten signifikant war.

3.4.4 Neutrophile Stabkernige

Vergleich Zoster-Patient versus VZV-seropositiver Träger

Zum Zeitpunkt der akuten Zoster-Erkrankung bzw. x0 wurde ein hoch signifikanter Unterschied ($p=0.001$) des prozentualen Anteils der neutrophilen Stabkernigen der Zosterpatienten im Vergleich zu denen der VZV-seropositiven Kontrollpatienten gemessen. Der prozentuale Anteil der Zoster-Patienten war

mit $10,3 \pm 11,6\%$ im Vergleich zu den VZV-seropositiven Trägern mit $2,4 \pm 3,3\%$ erhöht. Die folgende Abbildung (Abb.3.13.) veranschaulicht die Ergebnisse dieser Messung. Nach vier Wochen war bei den Zoster-Patienten der prozentuale Anteil auf $5,5 \pm 5,3\%$ erniedrigt und die der Kontrollgruppe auf $6,5 \pm 4,8\%$ angestiegen. Bei der letzten Untersuchung nach sechs Monaten betrug der Anteil der an einem Zoster erkrankten Patienten $3,2 \pm 1,5\%$ und die der VZV-seropositiven Träger $4,7 \pm 3,5\%$.

Die gemessenen Mittelwerte lagen sämtlich, außer bei den Zosterpatienten beim akuten Krankheitsbeginn, unterhalb der Norm $<8\%$.

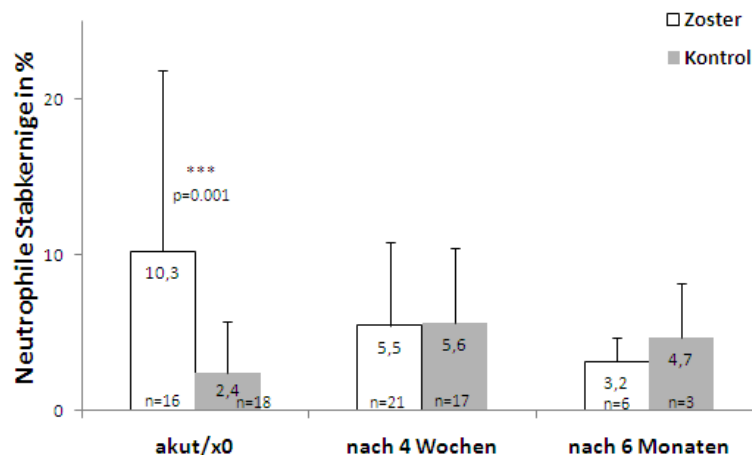


Abbildung 3.13: **Prozentualer Anteil der Neutrophilen Stabkernigen der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.**

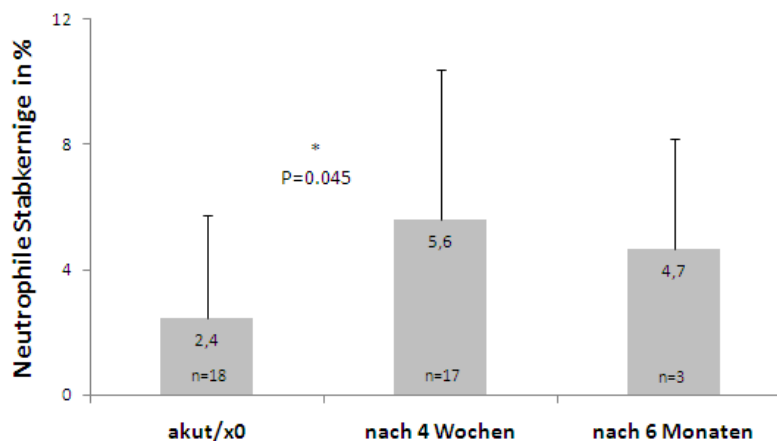


Abbildung 3.14: **Kontroll-Patient.** Hier verdeutlicht die Graphik den Anstieg des prozentualen Anteils der Neutrophilen Stabkernigen im zeitlichen Verlauf, welcher sich signifikant zwischen den ersten beiden Messpunkten zeigte.

Vergleich innerhalb der Probandengruppe

Bei den VZV-seropositiven Kontroll-Patienten zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei der Betrachtung zwischen den Zeitpunkten der Untersuchung.

Zum ersten Messpunkt x0 betrug der prozentuale Anteil der neutrophilen Stabkernigen $2,4 \pm 3,3\%$ und stieg zum zweiten Messpunkt signifikant ($p=0.045$) auf $5,6 \pm 4,9\%$ ab. Nach sechs Monaten fiel der prozentuale Anteil auf $4,7 \pm 3,5\%$ ab (Abb.3.14.).

3.5 Immunstatus

An dieser Stelle sei auf Tabelle 6.24 im Anhang hingewiesen. Sie enthält die in dieser Arbeit verwendeten laborspezifischen Referenzwerte für die Lymphozyten Subpopulationen. Unter 6.4.5 sind im Anhang alle Daten zum Immunstatus aufgeführt.

3.5.1 Gesamt-Lymphozyten

Vergleich Zoster-Patient versus VZV-seropositiver Träger

Bei den Absolutzahlen waren für den Zeitpunkt akut bzw. x0 die Anzahl der Gesamt-Lymphozyten bei den Zoster-Patienten mit $1361,4 \pm 891,6/\mu\text{l}$ zu dem Wert der Kontrollgruppe aus VZV-seropositiven Trägern mit $2516,7 \pm 1583,0/\mu\text{l}$ sehr signifikant ($p=0.003$) erniedrigt. Bei der Verlaufskontrolle nach vier Wochen waren die Werte der Zoster-Patienten weiter signifikant mit $1578,6 \pm 641,3/\mu\text{l}$ gegenüber der Kontrollgruppe mit $2132,4 \pm 929,7/\mu\text{l}$ ($p=0.047$) erniedrigt. Nach sechs Monaten glichen sich die Absolutzahlen der Gesamt-Lymphozyten der Zoster-Patienten denen der Kontroll-Patienten mit $1730,0 \pm 780/\mu\text{l}$ zu $1573,3 \pm 851,5/\mu\text{l}$ wieder an ($p=0.796$) (Abb.3.15.).

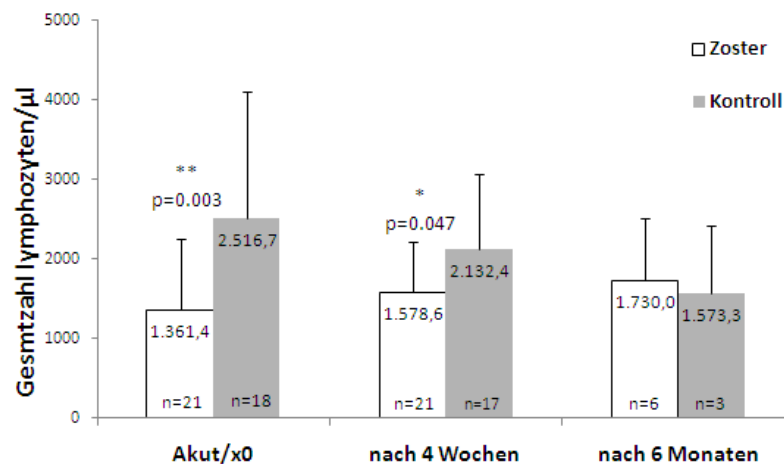


Abbildung 3.15: Anzahl der Gesamt-Lymphozyten der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

Die Werte der Zosterpatienten befanden sich zum akuten Zeitpunkt und nach vier Wochen unterhalb der Normwerte ($1600-2400/\mu\text{l}$). Nach 6 Monaten lagen die Werte im Normbereich, die gemessenen Werte der VZV-seropositiven Trägern lagen zu allen drei Zeitpunkten im Normbereich.

Die Gesamt-Lymphozyten wurden nicht nur absolut, sondern auch prozentual als Anteil der Lymphozyten am Gesamtblutbild ermittelt. Dieser prozentuale Anteil war für den Zeitpunkt akut bzw. x0 bei den Zoster-Patienten mit $23,2 \pm 19,4\%$ gegenüber den VZV-seropositiven Trägern mit $31,2 \pm 12,1\%$ sehr signifikant ($p=0.015$) erniedrigt. Nach vier Wochen erhielten sich die Werte der Zoster-Patienten mit $25,9 \pm 11,4\%$ und waren damit ähnlich zu den Zellzahlen zum ersten Messzeitpunkt unterhalb der Normgrenze ($28-29\%$) weiter verringert. Die Zellzahlen der Kontrollgruppe lagen mit $27,7 \pm 9,6\%$ nahezu gleichbleibend erniedrigt vor. Somit waren die Zellzahlen im Vergleich statistisch gesehen gleich ($p=0.566$). Nach sechs Monaten war der prozentuale Anteil der Zoster-Patienten im Vergleich der Kontroll-Gruppe mit $31,0 \pm 8,8\%$ zu $26,3 \pm 11,2\%$ leicht erhöht ($p=0.795$) (Abb.3.16.).

Der Normbereich für die Gesamt-Lymphozyten liegt bei $28-29\%$, d.h. bei den Patienten mit einem akuten Zoster lagen die Werte bei den ersten beiden Messzeitpunkten unterhalb der Norm und nach 6 Monaten oberhalb der Norm.

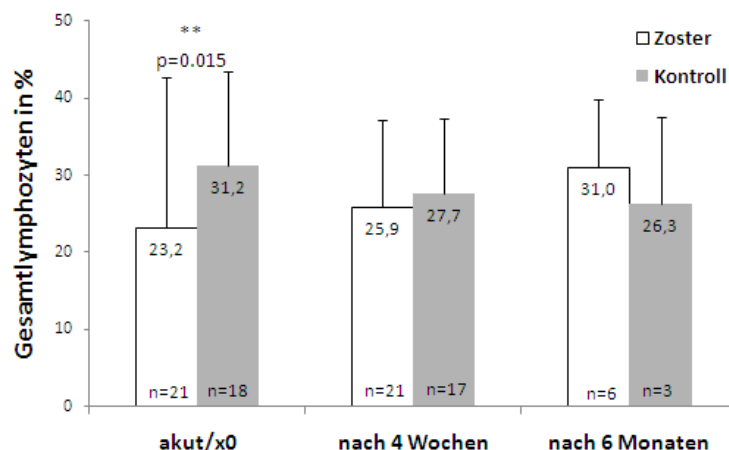


Abbildung 3.16: Prozentualer Anteil der Gesamt-Lymphozyten der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

3.5.2 T-Lymphozyten

Vergleich Zoster-Patient versus VZV-seropositiver Träger

Es zeigt sich bei der ersten Untersuchung eine sehr signifikante ($p=0.004$) Erniedrigung der Absolutzahlen der T-Lymphozyten bei den Zoster-Patienten mit $989,0 \pm 711,8/\mu\text{l}$ gegenüber der Kontrollgruppe mit $1845,0 \pm 1391,5/\mu\text{l}$. Nach vier Wochen war die Zellpopulation der an einem Zoster erkrankten Probandengruppe mit $1199,1 \pm 489,1/\mu\text{l}$ gegenüber der Gruppe der VZV-seropositiven Trägern $1534,7 \pm 839,1/\mu\text{l}$ noch erniedrigt, jedoch nicht signifikant ($p=0.223$).

Bei einer Kontrolle der Zellzahlen nach sechs Monaten waren die Absolutzahlen der Zosterpatienten mit $1381,7 \pm 682,7/\mu\text{l}$ im Vergleich der Absolutzahlen der Kontrollpatienten mit $1136,7 \pm 653,1/\mu\text{l}$ erhöht ($p=0.302$). (Abb.3.17.). Die Messwerte der Zosterpatienten lagen zum ersten Untersuchungszeitpunkt unterhalb des Normbereiches ($1100\text{-}1700/\mu\text{l}$) und zum Zeitpunkt nach 4 Wochen und nach 6 Monaten innerhalb des normalen Bereiches. Die Kontrollpatienten hatten bei allen drei Messungen Zellzahlen, die innerhalb des Normbereiches lagen.

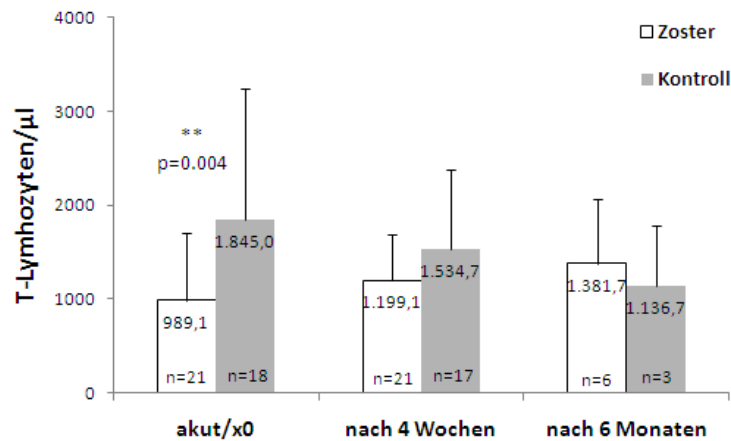


Abbildung 3.17: Anzahl der T-Lymphozyten der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

Die Messwerte des prozentualen Anteils der T-Lymphozyten an den Gesamtlmphozyten zeigt sich zum ersten Untersuchungszeitpunkt (akut bzw. x0) bei den Zosterpatienten mit $76,9 \pm 7,9\%$ gegenüber den Kontrollpatienten mit $71,4 \pm 9,5\%$ leicht erhöht ($p=0.062$).

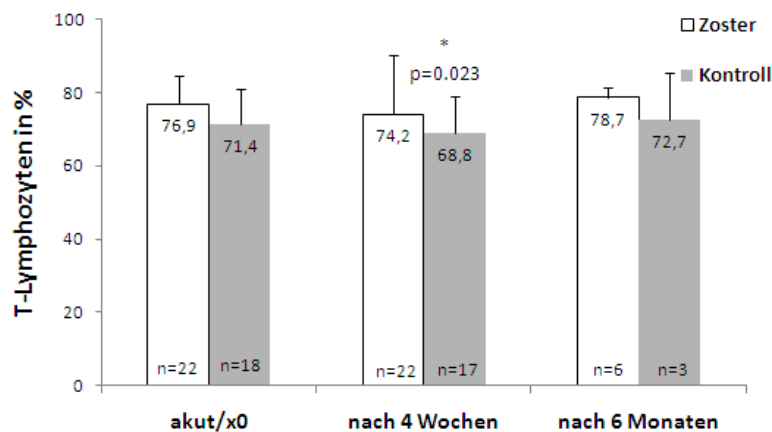


Abbildung 3.18: Prozentualer Anteil der T-Lymphozyten der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

Nach vier Wochen wurden signifikant ($p=0.023$) erhöhte Prozentzahlen der Zoster-Patienten mit $74,2\pm 15,9\%$ im Vergleich zu denjenigen der VZV-seropositiven Trägern ($68,8\pm 10,0\%$) gemessen. Zum Zeitpunkt nach sechs Monaten waren die Werte im Vergleich der Zosterpatienten mit $78,7\pm 2,9\%$ mit denen der Kontrollpatienten $72,7\pm 12,7\%$ wenig erhöht ($p=0.437$). Abb.3.18. stellt den Verlauf der prozentualen Zellzahlen der T-Lym phozyten dar. Die Zellzahlen der Zosterpatienten und der Kontrollpatienten lagen zu jedem Zeitpunkt innerhalb des Normbereiches ($67\text{--}76\%$).

3.5.3 B-Lymphozyten

Vergleich Zoster-Patient versus VZV-seropositiver-Träger

Bei der Zellpopulation der B-Lymphozyten zeigt sich zum Zeitpunkt akut/x0 eine sehr signifikante ($p=0.006$) Verminderung der Absolutzahlen in der Zostergruppe. Diese betrugen $98,4\pm 84,7/\mu\text{l}$, während bei der Kontroll-Gruppe ein Mittelwert von $201,1\pm 163,6/\mu\text{l}$ messbar war. Nach vier Wochen waren die Werte der Zoster-Patienten mit $112,8\pm 68,8/\mu\text{l}$ gegenüber den VZV-seropositiven Trägern mit $173,5\pm 112,5/\mu\text{l}$ weiter erniedrigt ($p=0.108$). Bei einer Kontrolle nach 6 Monaten waren die Zellzahlen im Mittel beider untersuchten Gruppen gleich hoch (Zosterpatienten $140\pm 66,3/\mu\text{l}$ und Kontrollpatienten $140\pm 149,3/\mu\text{l}$) ($p=0.439$) (Abb.3.19.).

Der Normbereich der B-Lymphozyten liegt zwischen $200\text{--}400/\mu\text{l}$ und damit liegen die gemessenen Zellzahlen der Zosterpatienten zu allen drei Messzeitpunkten unterhalb des Normbereichs. Bei den Kontrollpatienten lagen die Werte nach 4 Wochen und nach 6 Monaten unterhalb von $200/\mu\text{l}$.

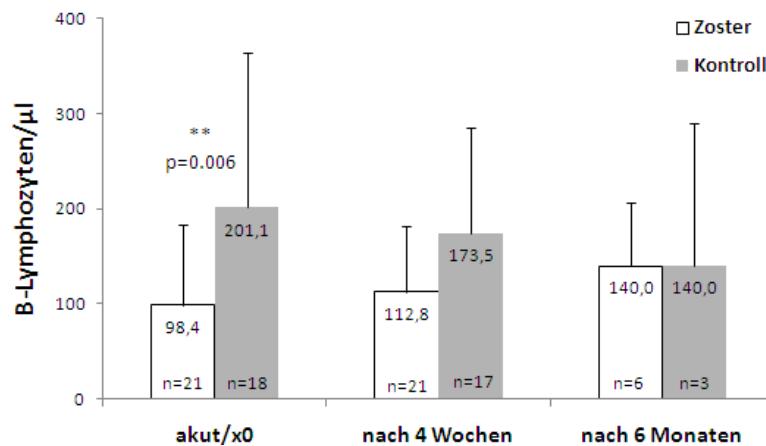


Abbildung 3.19: Anzahl der B-Lymphozyten der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

Zum Zeitpunkt akut/x0 waren auch die B-Lymphozyten prozentual bei den Zoster-Patienten mit $8,3\pm 4,9\%$ gegenüber der Kontrollgruppe mit $7,9\pm 3,6\%$ erniedrigt ($p=0.806$). Nach vier Wochen waren die Werte der Zoster-Patienten

mit $7,1 \pm 3,6\%$ gegenüber den VZV-seropositiven Trägern ($8 \pm 3,3\%$) erhöht. Dieser messbare Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p=0.385$). Bei einer Kontrolle nach 6 Monaten war der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten bei den Zosterpatienten mit $8,3 \pm 2,7\%$ im Vergleich mit den Werten der VZV-seropositiven Träger mit $7 \pm 2,6\%$ erhöht ($p=0.439$) (Abb.3.20.). Bei den Zoster- und Kontrollpatienten lagen zu allen drei Messzeitpunkten der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten unterhalb der Normwerte (11-16%).

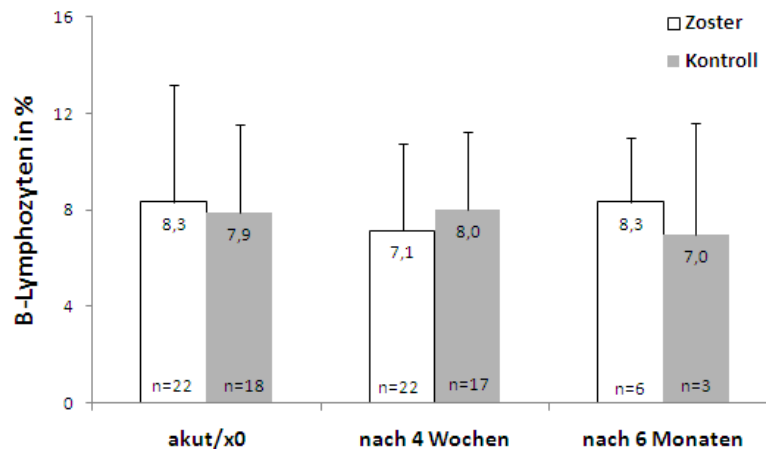


Abbildung 3.20: Prozentualer Anteil der B-Lymphozyten der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

3.5.4 T-Suppressorzellen

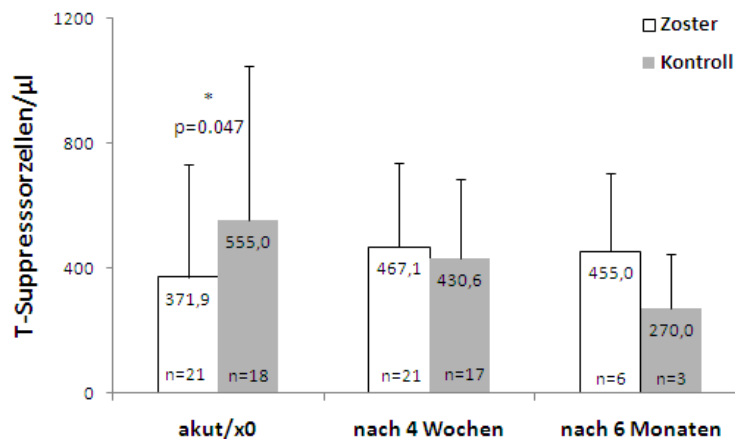


Abbildung 3.21: Anzahl der T-Suppressorzellen der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

Vergleich Zoster-Patient versus VZV-seropositiver Träger

Die Absolutzahlen der T-Suppressorzellen waren in der Untersuchung zum

Zeitpunkt akut/x0 bei den Zoster-Patienten im arithmetischen Mittelwert mit $371,9 \pm 359,6/\mu\text{l}$ im Vergleich zu denen der Kontroll-Patienten mit $555,0 \pm 492,2/\mu\text{l}$ signifikant ($p=0.047$) erniedrigt. Im Verlauf nach vier Wochen erhalten sich die Werte der Zosterpatienten mit $467,1 \pm 272,3/\mu\text{l}$ und waren gegenüber den Kontrollpatienten mit $430,6 \pm 254,7/\mu\text{l}$ leicht erhöht ($p=0.547$). Im Vergleich zum dritten Untersuchungszeitpunkt nach sechs Monaten zeigten sich bei der Zostergruppe ($455 \pm 247,4/\mu\text{l}$) gegenüber der Kontrollgruppe ($270,0 \pm 173,5/\mu\text{l}$) erhöhte Werte, die jedoch nicht signifikant waren ($p=0.243$) (Abb.3.21.). Außer zum ersten Messzeitpunkt x0 der Kontrollpatienten lagen alle Messwerte der Zoster- und Kontrollpatienten außerhalb des Normbereichs von 500 bis $900/\mu\text{l}$.

Bei der Analyse des prozentualen Anteiles der T-Suppressorzellen zum Zeitpunkt akut/x0 waren diese bei den Zosterpatienten mit $28,3 \pm 12,4\%$ gegenüber der Kontrollgruppe ($21,3 \pm 6,3\%$) erhöht ($p=0.134$). In der Messung der Verlaufuntersuchung nach vier Wochen, stiegen diese signifikant an ($p=0.013$). Es konnte bei den Zoster-Patienten ein Messwert von $31,4 \pm 15,1\%$ und bei den VZV-seropositiven Trägern ein Wert von $19,9 \pm 5,9\%$ ermittelt werden. Nach 6 Monaten fielen die Prozentzahlen der an Zoster erkrankten Patienten ($26,8 \pm 9,6\%$), waren aber im Vergleich mit den Werten der VZV-seropositiven Träger ($18 \pm 9,0\%$) nicht signifikant ($p=0.197$) erhöht. Abb.3.22. veranschaulicht diesen Zusammenhang.

Der Normbereich der T-Suppressorzellen in Prozent liegt bei 31-40%. Außer zum Zeitpunkt nach 4 Wochen bei den Zosterpatienten, liegen somit alle gemessenen Werte der Zoster- und Kontrollpatienten zum ersten Zeitpunkt, nach 4 Wochen und nach 6 Monaten unterhalb der Norm.

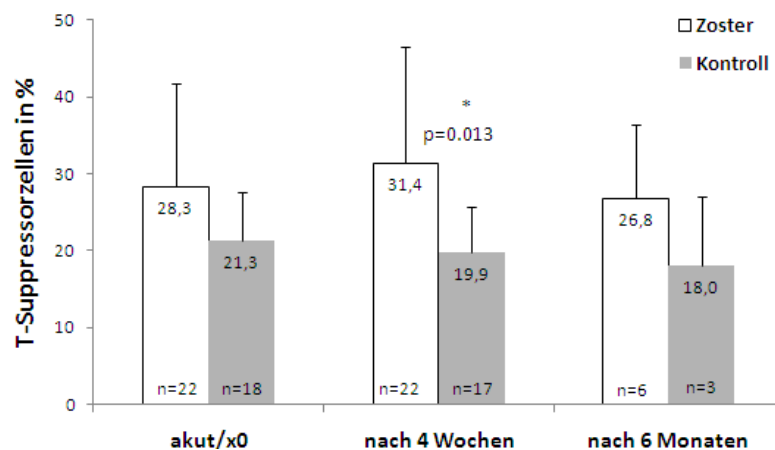


Abbildung 3.22: Prozentualer Anteil der T-Suppressorzellen der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

Vergleich innerhalb der Probandengruppe

Die Anzahl der absoluten T-Suppressorzellzahlen der Zoster-Patienten lagen beim akuten Krankheitsbeginn bei $371,9 \pm 13,4/\mu\text{l}$, stiegen nach vier Wochen auf $467,1 \pm 272,3/\mu\text{l}$ an und fielen nach sechs Monaten leicht auf $455,0 \pm 247,4/\mu\text{l}$.

Zwischen dem ersten und zweiten Messzeitpunkt war dieser Unterschied signifikant ($p=0.044$) (Abb.3.23.).

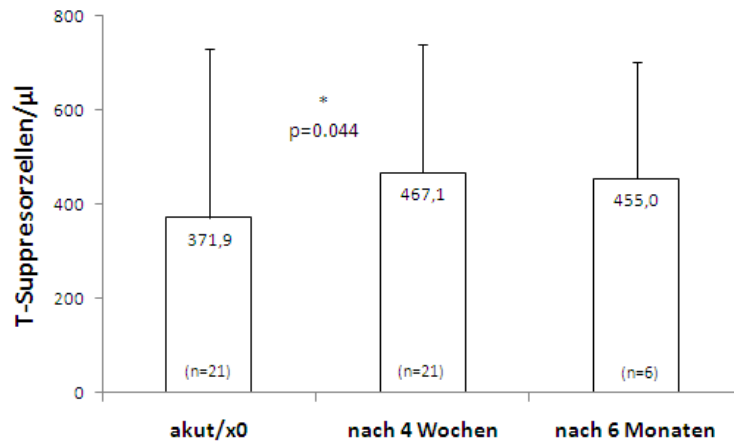


Abbildung 3.23: **Zoster-Patient.** Der Vergleich der absoluten Mittelwerte zwischen dem Zeitpunkt akut und der Zellzahlmessung nach vier Wochen ist signifikant.

3.5.5 T-Helferzellen

Vergleich Zoster-Patient versus VZV-seropositiver Träger

Es zeigten sich bei den Zoster-Patienten hoch signifikant ($p=0.001$) verminderte Absolutzahlen der T-Helferzellen zum akuten/x0 Zeitpunkt mit $604,7 \pm 467,6/\mu\text{l}$ im Vergleich zu den VZV-seropositiven Trägern mit $1313,3 \pm 945,4/\mu\text{l}$ (Abb.3.24)

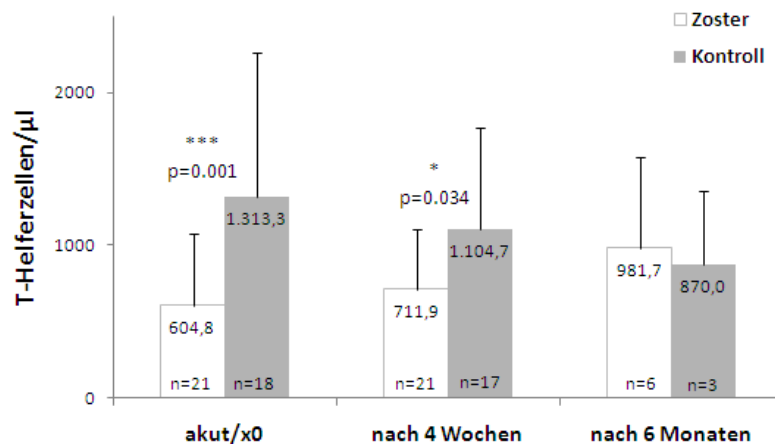


Abbildung 3.24: Anzahl der T-Helferzellen der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

Nach vier Wochen war zwischen den Probandengruppen weiterhin ein signifikanter ($p=0.034$) Unterschied messbar. Bei den Zoster-Patienten lagen die Absolutwerte bei $711,9 \pm 394,1/\mu l$ und bei den VZV-seropositiven Trägern bei $1104,7 \pm 663,8/\mu l$. Nach sechs Monaten waren die Zellzahlen der Zosterpatienten auf $981,7 \pm 592,6/\mu l$ angestiegen, und bei der Kontrollgruppe lagen sie bei $870,0 \pm 482,2/\mu l$ ($p=0.697$).

Der Normbereich der T-Helferzellen liegt bei $700-1100/\mu l$. Die Werte der Zoster-Patienten zum akuten Erkrankungsbeginn lagen unterhalb der Normwerte.

Die prozentualen Messwerte der T-Helferzellen an den Lymphozyten-Subpopulationen waren zum ersten Untersuchungszeitpunkt bei den Zosterpatienten ($48,2 \pm 13,7\%$) im Vergleich zu denen der Kontrollpatienten ($51 \pm 9,6\%$) vermindert ($p=0.744$). Nach vier Wochen waren die Zellzahlen der an einem Zoster erkrankten Patienten mit $43,7 \pm 13,6\%$ weiter erniedrigt. Der prozentuale Anteil der Kontrollgruppe lag bei $49,4 \pm 10,0\%$. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0.251$). Bei einer weiteren Kontrolle nach 6 Monaten lag der prozentuale Anteil der T-Helferzellen bei der Gruppe der Zosterpatienten mit $54,5 \pm 7,2\%$ ähnlich zu denen der VZV-seropositiven Träger mit $55,3 \pm 5,0\%$ ($p=0.795$). Abb.3.25. zeigt den Verlauf des prozentualen Anteiles der T-Helferzellen im Vergleich zwischen den Gruppen.

Die gemessenen Werte lagen bei beiden Probandengruppen zu allen Zeitpunkten innerhalb oder oberhalb der Norm ($38-46\%$).

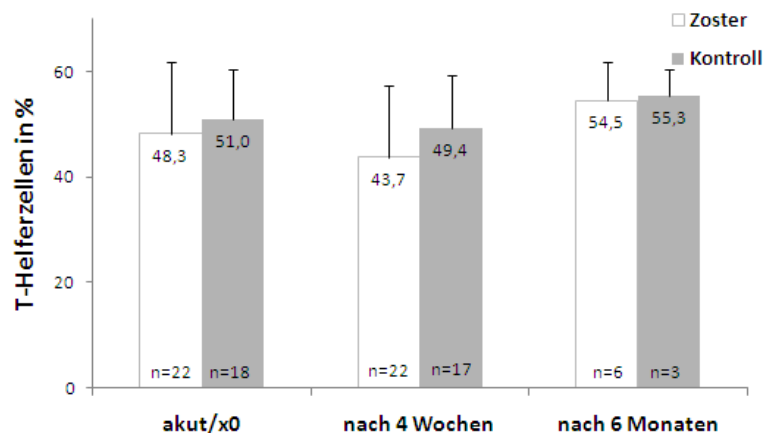


Abbildung 3.25: Prozentualer Anteil der T-Helferzellen der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

3.5.6 Aktivierte T-Zellen

Vergleich Zoster-Patient versus VZV-seropositiver Träger

Zum Zeitpunkt der ersten Messung war eine signifikante ($p=0.034$) Suppression der absoluten Zellpopulation der aktivierten T-Zellen ($CD3+$, $CD4+$) bei den Zoster-Patienten mit $144,3 \pm 100,7/\mu l$ im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($257,2 \pm 227,5/\mu l$) zu vermerken. Nach vier Wochen waren die Zellen der Zos-

terpatienten auf $197,1 \pm 193,6/\mu\text{l}$ angestiegen und die Absolutzahlen der Kontrollgruppe auf $217,1 \pm 193,1/\mu\text{l}$ abgefallen. Im Vergleich zwischen den Gruppen war keine Signifikanz ($p=0.480$) messbar. Zum dritten Untersuchungszeitpunkt nach sechs Monaten sanken die absoluten Zellzahlen der an einem Zoster erkrankten Patienten auf $90,0 \pm 42,0/\mu\text{l}$ und die der VZV-seropositiven Träger auf $133,3 \pm 25,2/\mu\text{l}$ ($p=0.118$) (Abb.3.26.).

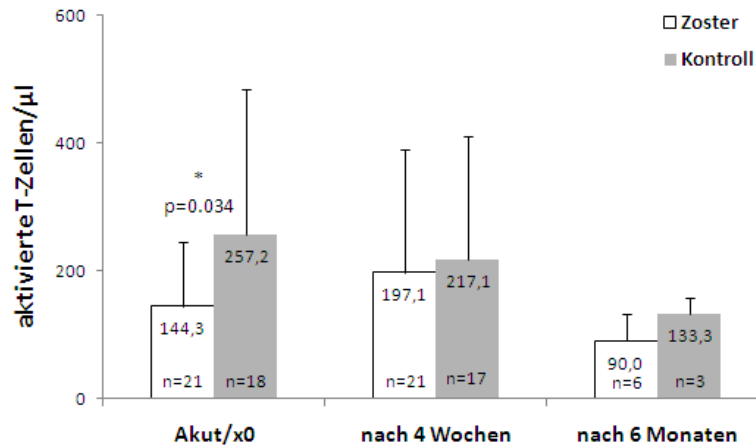


Abbildung 3.26: Anzahl der aktivierten T-Zellen der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

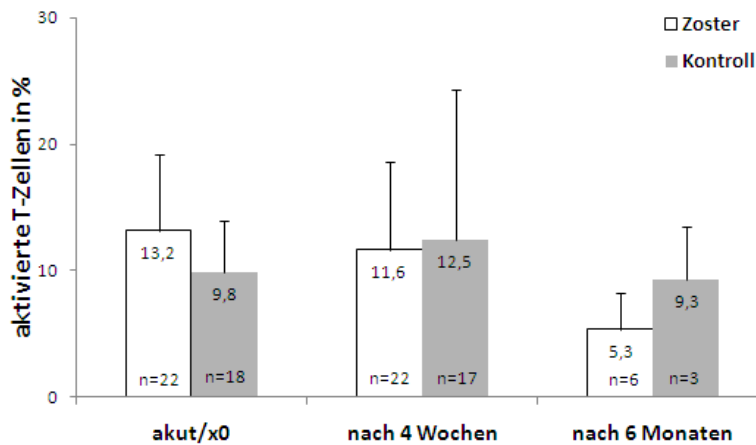


Abbildung 3.27: Prozentualer Anteil der aktivierten T-Zellen der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

Der Vergleich des gemessenen prozentualen Anteils der aktivierten T-Zellen war zwischen den Gruppen zu keinem Zeitpunkt signifikant. Die Zellzahlen der Zoster-Patienten lagen zum Zeitpunkt akut/x0 bei $13,2 \pm 6,0\%$ und die der Gruppe der VZV-seropositiven Trägern bei $9,8 \pm 4,1\%$ ($p=0.076$). Bei der Kontrolle der Zellzahlen nach vier Wochen waren die Zellen der Zosterpatienten

auf $11,6 \pm 9,6\%$ gefallen und die der Kontrollgruppe auf $12,5 \pm 6,9\%$ angestiegen ($p=0.670$). Zum letzten Untersuchungszeitpunkt nach sechs Monaten war der prozentuale Anteil der aktivierten T-Zellen bei den Zoster-Patienten mit $5,3 \pm 2,9\%$ und die der Kontrollgruppe mit $9,3 \pm 4,2\%$ messbar ($p=0.120$) (Abb.3.27).

Vergleich innerhalb der Probandengruppe

Bei den Zoster-Patienten konnten signifikante prozentuale Werte der aktivierten T-Zellen zwischen den Zeitpunkten des akuten Zosters ($13,2 \pm 6,03\%$) und der ersten Verlaufskontrolle nach vier Wochen ($11,6 \pm 6,93\%$) mit $p=0.028$ gemessen werden. Auch der Vergleich zwischen den Zeitpunkten nach vier ($13,2 \pm 6,03\%$) und nach sechs Monaten ($5,33 \pm 2,88\%$) war signifikant ($p=0.027$) (Abb.3.28.)

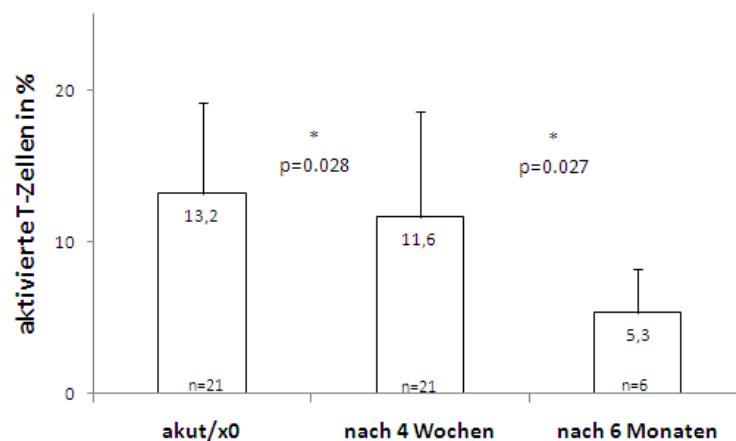


Abbildung 3.28: **Zoster-Patient.** Es zeigten sich Signifikanzen zwischen den jeweiligen Zeitpunkten Zoster akut und Verlauf nach vier Wochen, sowie zwischen den Untersuchungen zwischen vier Wochen und sechs Monaten.

3.5.7 NK-Zellen (CD 16+, CD 56+)

Vergleich Zoster-Patient versus VZV-seropositiver Träger

Die NK-Zellen zeigten sich in der Untersuchung bei den Zoster-Patienten sowohl zu Beginn als auch bei der Verlaufskontrolle nach vier Wochen deutlich erniedrigt. Es konnte zu Beginn eine hoch signifikante ($p=0.001$) Erniedrigung der absoluten Zellzahlen der NK-Zellen im Vergleich der an Zoster erkrankten Probanden ($119,5 \pm 101,2/\mu l$) zu den VZV-seropositiven Trägern ($462,2 \pm 503,0/\mu l$) gemessen werden (Abb.3.29). Nach vier Wochen zeigte sich eine Zunahme der Zellzahl innerhalb der an einem Zoster erkrankten Probandengruppe und eine Abnahme der Zellzahl bei den Kontroll-Patienten. Der Unterschied der NK-Zellen blieb hoch signifikant mit $p=0.001$ zwischen den Zoster-Patienten mit $219,5 \pm 228,0/\mu l$ und den Kontroll-Patienten $394,1 \pm 152,3/\mu l$ bestehen. Nach sechs Monaten waren die Absolutzahlen der NK-Zellen bei den Zoster-Patienten ($175 \pm 44,6/\mu l$) im Vergleich zu der Kontrollgruppe bei ($290 \pm 175,2/\mu l$) deutlich

erniedrigt, jedoch nicht signifikant messbar ($p=0.364$).

Der Normbereich liegt zwischen 200 und 400/ μl . Zum akuten Untersuchungszeitpunkt und nach sechs Monaten liegen die Werte der Zosterpatienten unterhalb der normalen Werte.

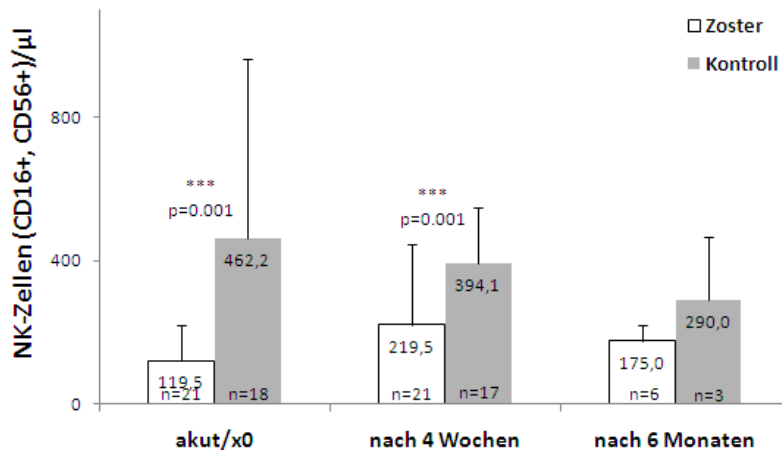


Abbildung 3.29: Anzahl der NK-Zellen (CD16+, CD56+) der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

Die Suppression des Immunsystems zeigt sich bei dieser Zellpopulation auch im prozentualen Anteil.

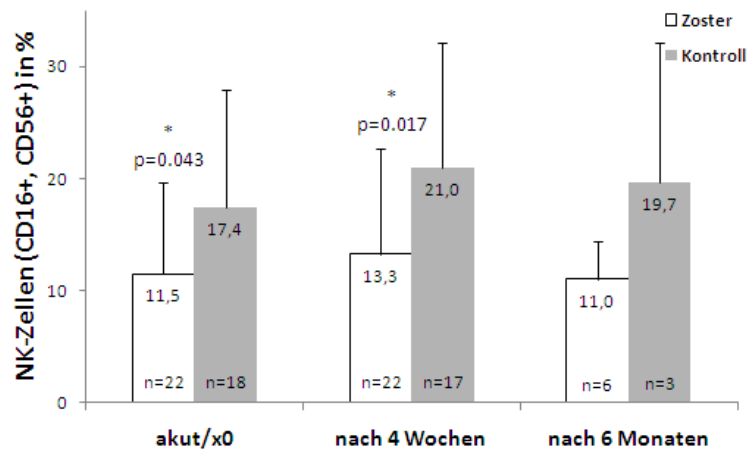


Abbildung 3.30: Prozentualer Anteil der NK-Zellen (CD16+, CD56+) der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

Zum ersten Untersuchungszeitpunkt war ein signifikanter ($p=0.043$) Unterschied zwischen den an einem Zoster erkrankten Probanden ($11,5 \pm 8,1\%$) und der Kontrollgruppe ($17,4 \pm 10,5\%$) feststellbar. Die Messwerte nach vier Wochen der

Zoster-Patienten mit $13,3 \pm 9,3\%$ im Vergleich zu den VZV-seropositiven Trägern mit $21,0 \pm 11,2\%$ ergaben eine Signifikanz von $p=0.017$. Zum Untersuchungszeitpunkt nach sechs Monaten war eine Zellzahl von $11 \pm 3,4\%$ bei den Zoster-Patienten und $19,7 \pm 12,4\%$ bei den Kontrollpatienten eruierbar ($p=0.195$). Der Zellverlauf wird in Abb.3.30. dargestellt.

Zu jedem Zeitpunkt liegen die Werte der Zoster- und Kontrollpatienten innerhalb des Normbereichs (10-19%).

Vergleich innerhalb der Probandengruppe

Bei der Messung der NK-Zellen der Zoster-Patienten zeigte sich eine Signifikanz ($p=0.028$) zwischen den Zeitpunkten akut mit $119,5 \pm 101,2/\mu l$ und der Verlaufskontrolle nach sechs Monaten mit $175,0 \pm 44,6/\mu l$. Nach vier Wochen war die Zellzahl bei $219,5 \pm 228,0/\mu l$ messbar. Dieser Zusammenhang ist graphisch in Abb.3.31 veranschaulicht.

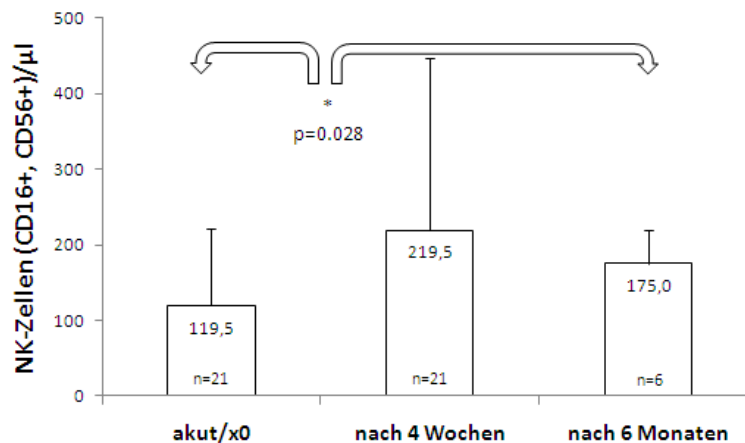


Abbildung 3.31: **Zoster-Patient.** Innerhalb dieser Patientengruppe zeigte sich eine Signifikanz zwischen der ersten und der letzten Messung nach sechs Monaten.

3.5.8 NK-Zellen (CD3+, CD16+, CD56+)

Vergleich Zoster-Patient versus VZV-seropositiver Träger

Zum Zeitpunkt akut/x0 waren die Absolutwerte der an einem Zoster erkrankten Probanden mit $77,6 \pm 101,2/\mu l$ und bei den VZV-seropositiven Trägern mit $97,8 \pm 60,1/\mu l$ messbar ($p=0.070$). Nach vier Wochen lagen die Zellzahlen der Zoster-Patienten ($70 \pm 62,2/\mu l$) deutlich niedriger als bei der Kontrollgruppe ($115,9 \pm 82,8/\mu l$) ($p=0.059$). Zum letzten Untersuchungszeitpunkt nach sechs Monaten stiegen die Zellzahlen der Zoster-Patienten auf $111,7 \pm 87,0/\mu l$ und die der VZV-seropositiven Trägern waren mit $73,3 \pm 45,1/\mu l$ nahezu stabil ($p=0.559$) (Abb. 3.32.).

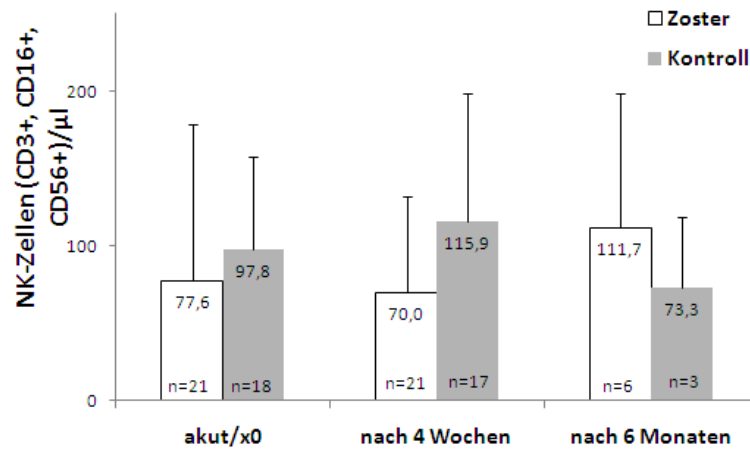


Abbildung 3.32: Anzahl der NK-Zellen (CD3+, CD16+, CD56+) der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

Bei der Analyse des prozentualen Anteils der NK-Zellen (CD3+, CD16+, CD56+) zum Zeitpunkt akut/x0 waren diese bei den Zoster-Patienten mit $7,3 \pm 7,3\%$ gegenüber den Kontroll-Patienten mit $4,3 \pm 2,9\%$ erhöht messbar. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0.147$). Nach vier Wochen lagen die Werte bei den an einem Zoster erkrankten Probanden bei $5,3 \pm 5,1\%$ und bei den VZV-seropositiven Trägern bei $6,5 \pm 5,1\%$ ($p=0.298$). Zum letzten Untersuchungszeitpunkt nach sechs Monaten stieg der prozentuale Anteil der NK-Zellen (CD3+, CD16+, CD56+) der Zoster-Patienten auf $6,2 \pm 3,7\%$ und fiel bei der Kontrollgruppe auf $5 \pm 3\%$ ($p=0.692$) (Abb. 3.33).

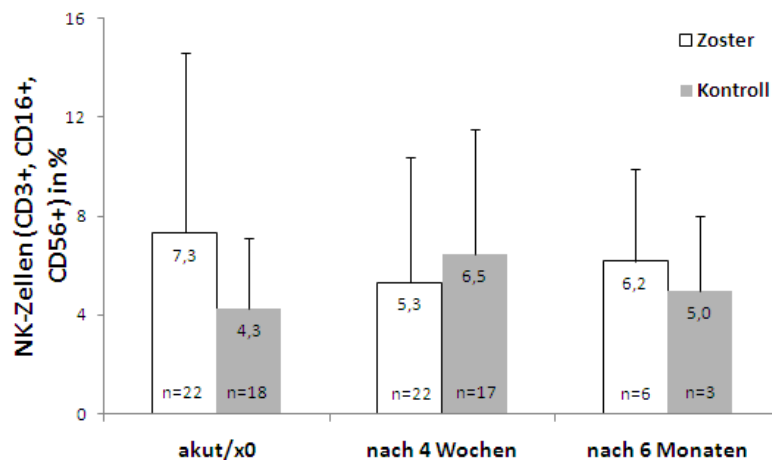


Abbildung 3.33: Prozentualer Anteil der NK-Zellen (CD3+, CD16+, CD56+) der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

Vergleich innerhalb der Probandengruppe

Eine Signifikanz ($p=0.043$) innerhalb der VZV-seropositiven Trägern fand sich bei den CD3, CD16 und CD56+ NK-Zellen zwischen den Zeitpunkten akut/x0 mit $4,3 \pm 2,9\%$ und der Verlaufskontrolle nach vier Wochen mit $6,5 \pm 5,1\%$. Dabei zeigte sich insgesamt ein Anstieg der prozentualen Zellpopulation. Nach sechs Monaten waren die Zellzahlen prozentual mit $5 \pm 3\%$ messbar. In der Abb.3.34. wird dies verdeutlicht.

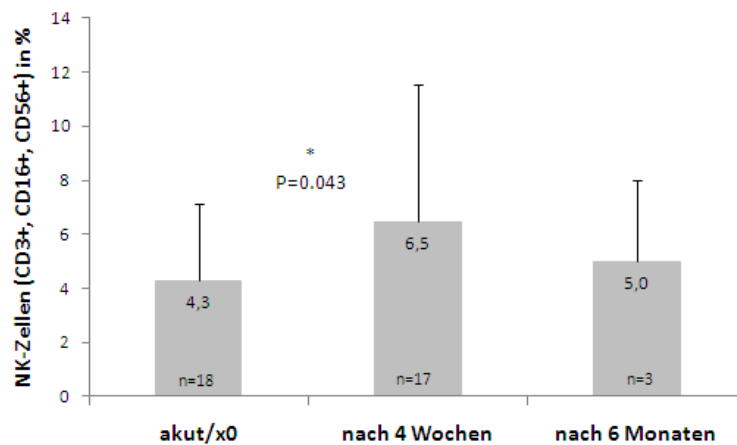


Abbildung 3.34: **Kontroll-Patient.** Hier zeigten sich signifikante Werte zwischen den Zeitpunkten x0 und nach vier Wochen.

3.5.9 CD4/CD8-Ratio

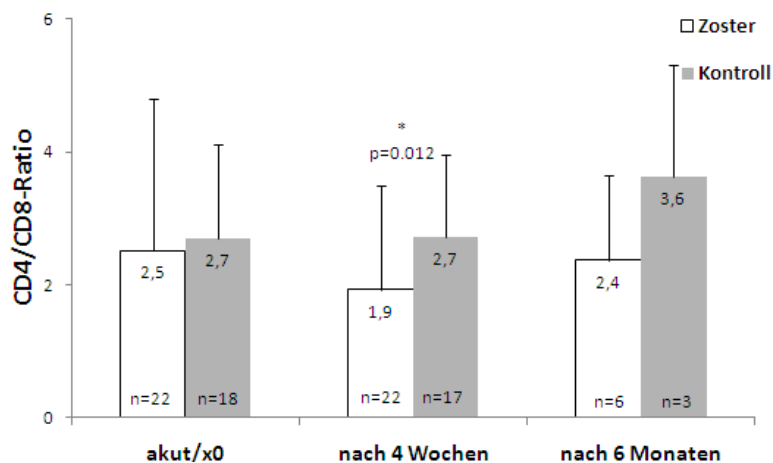


Abbildung 3.35: CD4/CD8-Ratio der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

Zoster-Patienten versus VZV-seropositive Träger

Die CD4/CD8-Ratio war zwischen den Gruppen zum ersten Untersuchungszeitpunkt ähnlich. Sie betrug bei den Zoster-Patienten $2,5 \pm 2,3$ und bei den Kontroll-Patienten $2,7 \pm 1,4$ ($p=0.253$). Nach vier Wochen lag der Wert der Zosterpatienten ($1,9 \pm 1,6$) signifikant ($p=0.012$) niedriger im Vergleich zu den VZV-seropositiven Trägern ($2,7 \pm 1,2$). Zum letzten Untersuchungszeitpunkt nach sechs Monaten stieg die Ratio der an einem Zoster erkrankten Patienten auf $2,4 \pm 1,3$ und die der Kontroll-Patienten ohne Signifikanzunterschied auf $3,6 \pm 1,7$ ($p=0.121$) (Abb. 3.35).

3.6 Serologie

Im Anhang unter 6.4.6 findet sich eine vollständige tabellarische Auflistung aller erhobenen serologischen Labordaten.

3.6.1 VZV Immunglobulin G

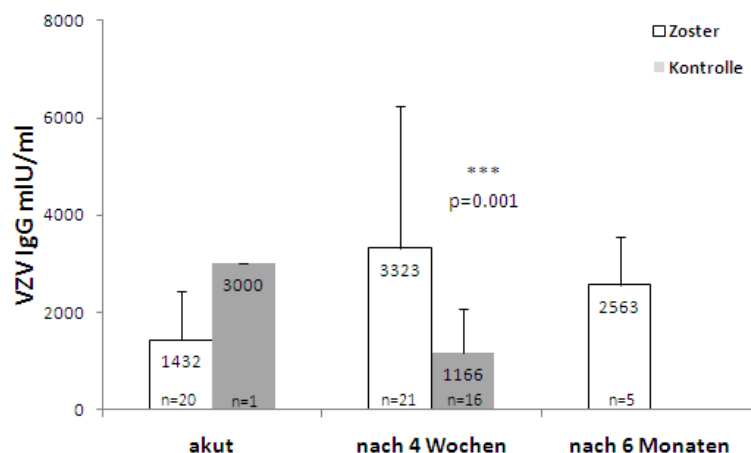


Abbildung 3.36: Anzahl des VZV Immunglobulin G im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

Vergleich Zoster-Patient versus VZV-seropositiver Träger

Zum ersten Messzeitpunkt akut/x0 waren bei den Zoster-Patienten Mittelwerte von $1432,6 \pm 994,3$ mIU/ml und bei den Kontrollpersonen wurde zum ersten Zeitpunkt nur bei einer Person das VZV-Immunglobulin G gemessen und betrug 3000 ± 0 mIU/ml. Da zu diesem Zeitpunkt zu viele Werte fehlten, konnte keine Gruppen-Signifikanz nachgewiesen werden. Bei der Messung der VZV-spezifischen Immunglobuline G nach vier Wochen zeigte sich bei den Zoster-Patienten eine deutliche Erhöhung der Werte gegenüber den Kontroll-Patienten, welche sich hoch signifikant ($p=0.001$) darstellte. So wurden bei den an Zoster erkrankten Patienten im Mittelwert IgG Werte von $3.323,3 \pm 2.907,3$ mIU/ml

und bei den VZV-seropositiven Trägern $1.166,0 \pm 906,7$ mlU/ml gemessen (Abb.3.36.). Nach sechs Monaten fiel der IgG Wert im Mittel bei den Zoster-Patienten auf $2563,4 \pm 976,3$ mlU/ml. Bei den Kontroll-Patienten wurde nach sechs Monaten keine Messung durchgeführt.

Vergleich innerhalb der Probandengruppe

Bei der Betrachtung der Patientengruppe mit akutem Herpes Zoster über die drei Zeitpunkte, fällt ein hoch signifikanter ($p=0.001$) Anstieg des IgG zwischen dem ersten ($1.431,6 \pm 994,3$ ml/Uml) und zweiten Messpunkt ($3.323,3 \pm 2907,3$ ml/Uml) auf. Weiterhin ist zwischen dem Messzeitpunkt nach vier Wochen mit $3.323,3 \pm 2907,3$ ml/Uml gegenüber der Messung nach sechs Monaten mit $2.563,4 \pm 976,3$ ml/Uml ein signifikanter ($p=0.042$) Abfall des Immunglobulin G festzustellen. Abb.3.37. veranschaulicht diesen Sachverhalt.

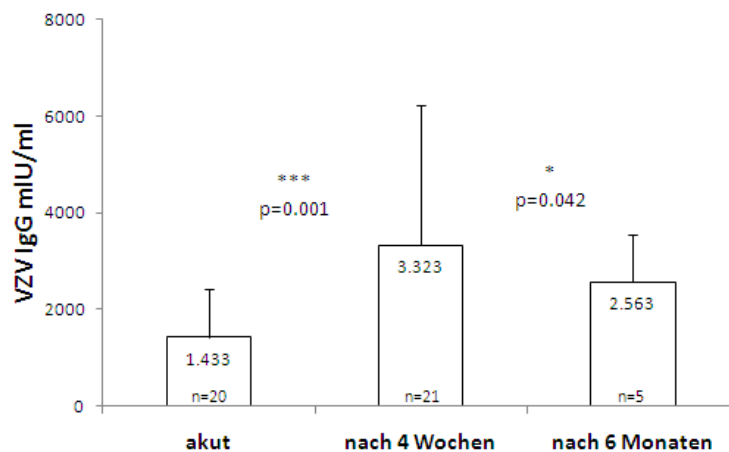


Abbildung 3.37: **Zoster-Patient.** Zwischen den Zeitpunkten des akuten Zosters und der Kontrolluntersuchung nach vier Wochen zeigt sich eine hoch signifikante Erhöhung. Zwischen den letzten beiden Messpunkten ist eine signifikante Erniedrigung zu messen.

3.6.2 VZV Immunglobulin M

Vergleich Zoster-Patient versus VZV-seropositiver Träger

Bei der Auswertung wurde ein positives VZV Ig M mit 1 definiert und ein negatives VZV Ig M mit einer 2 definiert. Traten grenzwertige Ergebnisse auf, wurde dieses mit 3 beziffert.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Probandengruppen zum ersten Messwert. Bei den Zosterpatienten war ein Mittelwert von $1,95 \pm 0,2$ und bei den Kontroll-Patienten 2 ± 0 ($n=1$). Zum zweiten Zeitpunkt (nach vier Wochen) konnte eine Signifikanz ($p=0.022$) festgestellt werden. Hier zeigten die Zoster-Patienten einen Mittelwert von $1,62 \pm 0,7$ gegenüber den VZV-seropositiven Trägern mit $2,0 \pm 0,0$ (Abb.3.38.). Nach sechs Monaten waren bei allen Zoster-Patienten die VZV IgM-Werte negativ ($2,0 \pm 0,0$).

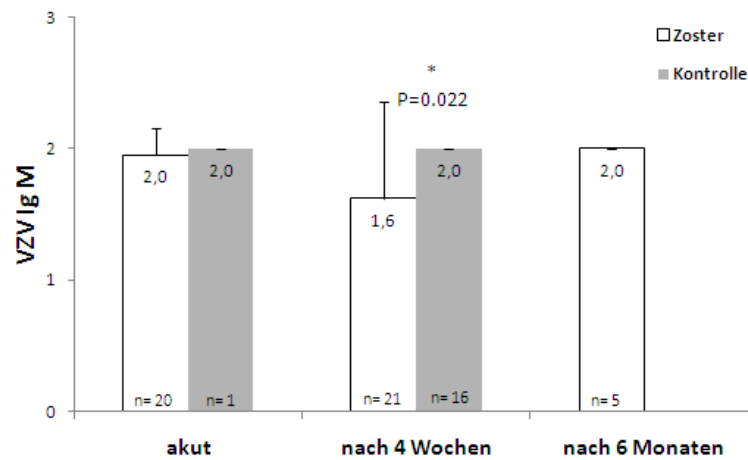


Abbildung 3.38: Anzahl des VZV Immunglobulin M im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen. positives VZV IgM = 1, negatives VZV IgM = 2, grenzwertiges IgM = 3.

3.7 ELISPOT-Assay Ergebnisse

Die vollständigen Daten sind im Anhang unter 6.4.7 dargestellt.

Bei der näheren Betrachtung der Ergebnisse ist zusammenzufassen, dass die VZV-spezifischen T-Zellen nie mit dem Medium reagiert haben. Das Medium fingierte als unspezifische negative Kontrolle, da es das Medium RPMI/HS 10% und die zu VZV-spezifischen CD4+ oder CD8+ T-Zellen enthielt.

Die Ergebnisse der VZV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen bei Reaktion mit dem VZV-Antigen werden graphisch und im Text im Kapitel 3.7.1 ausführlich erörtert.

Als weitere Negativkontrolle wurde neben dem Medium auch das Kontroll-Antigen eingesetzt. Nach Produktinformation der Herstellerfirma Insitut Virion/Serion GmbH handelt es sich bei dem Kontroll-Antigen "um ein entsprechend zur Antigenherstellung aufgearbeitet, nicht infiziertes Zellmaterial der jeweiligen Zelllinie". Bei den Ergebnissen in dieser Arbeit fällt auf, dass es sowohl bei den Zoster-Patienten, als auch bei den Kontroll-Patienten eine VZV-spezifische CD4+ und CD8+ T-Zellreaktion gemessen werden konnte. Dies war nicht zu erwarten und ist zu diskutieren.

Bei den CD4+T-Zellen wurde bei den Zoster-Patienten beim akuten Krankheitsbeginn erhöhte SFC mit $0,47 \pm 1,61$ VZV-spezifische CD4+T-Zelle/ 6×10^5 CD8-PBMC im Vergleich zu den VZV-seropositiven Trägern ($0,06 \pm 0,27$ VZV-spezifische CD4+T-Zelle/ 6×10^5 CD8-PBMC nach Reaktion mit dem Kontroll-Antigen gemessen. Bei der zweiten Messung nach vier Wochen stieg die Anzahl der SFC auf $0,77 \pm 1,44$ VZV-spezifische CD4+T-Zelle/ 6×10^5 CD8-PBMC bei den Zoster-Patienten sehr signifikant ($p=0.027$) gegenüber $0,22 \pm 0,59$ VZV-spezifische CD4+T-Zelle/ 6×10^5 CD8-PBMC der Kontrollgruppe. Nach sechs Monaten sank die

Anzahl der SFC bei den Zoster-Patienten $0,21 \pm 0,60$ VZV-spezifische CD4+T-Zelle/ 6×10^5 CD8-PBMC.

Die Anzahl der VZV-spezifischen CD8+T-Zellen war beim ersten Messzeitpunkt mit $0,44 \pm 0,86$ VZV-spezifische CD8+T-Zelle/ 6×10^5 CD4-PBMC bei den Zoster-Patienten deutlich gegenüber den VZV-seropositiven Trägern mit $0,19 \pm 0,75$ VZV-spezifische CD8+T-Zelle/ 6×10^5 CD4-PBMC erhöht. Nach vier Wochen stieg die SFC der Zosterpatienten $0,91 \pm 3,06$ VZV-spezifische CD8+T-Zelle/ 6×10^5 CD4-PBMC und bei den Kontrollpatienten sank sie auf $0,08 \pm 0,34$ VZV-spezifische CD8+T-Zelle/ 6×10^5 CD4-PBMC. Zu diesem Zeitpunkt lag im Vergleich ein signifikanter Unterschied * mit $p=0.034$ vor. Zum letzten Messzeitpunkt nach sechs Monaten waren bei den Zosterpatienten keine VZV-spezifischen CD8+ T-Zellen nach Inkubation mit dem Kontroll-Antigen messbar.

Als unspezifische positive Kontrolle wurde in dieser Arbeit das Lectin PHA genutzt. Es soll geprüft werden, ob die eingesetzten T-Zellen prinzipiell ihre Immunfunktion erhalten haben. Sowohl bei den Zoster-Patienten, als auch bei den VZV-seropositiven Trägern konnte zu jedem Messzeitpunkt SFC nach Separation der CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen gemessen werden.

3.7.1 VZV-spezifische T-Zellantwort

Die eingesetzten Zellzahlen nach der MACS-Separation (3×10^5 CD8-PBMC bzw. CD4-PBMC/ well bis auf maximal 10×10^5 CD8-PBMC bzw. CD4-PBMC/ well) wurden zur statistischen Vergleichbarkeit auf 6×10^5 CD8-PBMC bzw. CD4-PBMC umgerechnet.

Vergleich VZV-spezifischer T-Zellen im Vergleich zwischen Zoster-Patient versus VZV-seropositiver Träger

VZV-spezifische CD4+ T-Zellen

Zum ersten Untersuchungszeitpunkt konnte bei den Patienten mit akutem Herpes Zoster eine hochsignifikante ($p=0.001$) Erhöhung der Anzahl der spot forming cells (SFC = VZV-spezifische Zellen) mit $3,0 \pm 5,3$ VZV-spezifische CD4+T-Zelle/ 6×10^5 CD8-PBMC (das entspricht 1,0 von 200.000 CD4+T-Zellen) im Vergleich zu den VZV-seropositiven Trägern ($0,2 \pm 0,9$ VZV-spezifische CD4+T-Zelle/ 6×10^5 CD8-PBMC, was 1,0 von 3.000.000 CD4+T-Zellen) nach Inkubation mit dem VZV-Antigen festgestellt werden. Bei der zweiten Messung nach vier Wochen konnte ebenfalls ein signifikanter ($p=0.026$) Unterschied zwischen den beiden Probandengruppen gemessen werden. Dieser war mit $0,7 \pm 2,4$ VZV-spezifische CD4+T-Zelle/ 6×10^5 CD8-PBMC (entspricht 1,0 von 857.143 CD4+T-Zellen) bei den Zoster-Patienten gegenüber $0,1 \pm 0,3$ VZV-spezifische CD4+T-Zelle/ 6×10^5 CD8-PBMC (entspricht 1,0 von 6000.000 CD4+ T-Zellen) bei den Kontroll-Patienten messbar. Nach sechs Monaten betrug die Anzahl der SFC bei den Zoster-Patienten $0,1 \pm 0,2$ VZV-spezifische CD4+T-Zelle/ 6×10^5 CD8-PBMC

(entspricht 1,0 von 6000.000 CD4+ T-Zellen). Für die VZV-seropositiven Träger liegen zum Zeitpunkt nach sechs Monaten keine Daten vor (Siehe Abb.3.39.).

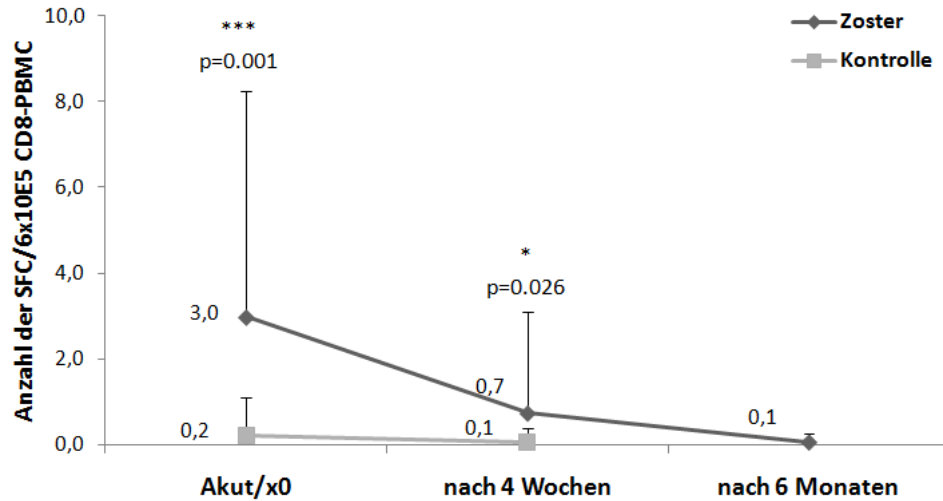


Abbildung 3.39: Anzahl der SFC (spotting forming cells) der CD 8-PBMC (entspricht der VZV-spezifischen CD4+ T-Zellantwort) der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

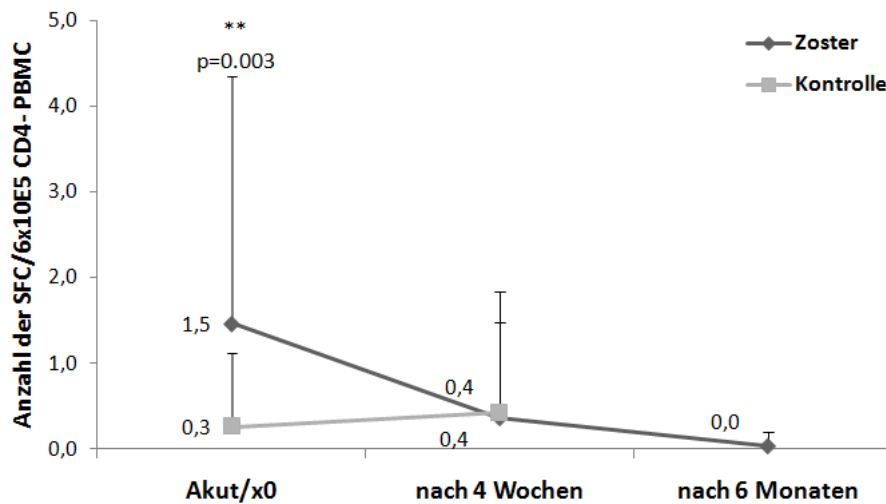


Abbildung 3.40: Anzahl der SFC der CD 4-PBMC (entspricht der VZV-spezifischen CD8+ T-Zellantwort) der Zosterpatienten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpersonen.

VZV-spezifische CD8+T-Zellen

Zum ersten Messzeitpunkt akut war die Anzahl der VZV-spezifischen CD8+T-Zellen ebenfalls im Vergleich zwischen den Zoster-Patienten zu den VZV-sero

positiven Kontrollpersonen sehr signifikant ($p = 0.003$) erhöht. Die Anzahl der SFC war mit $1,5 \pm 2,9$ VZV-spezifische CD8+T-Zelle/ 6×10^5 CD4-PBMC (entspricht 1,0 von 400.000 CD8+ T-Zellen) bei den Zoster-Patienten deutlich gegenüber den VZV-seropositiven Trägern mit $0,3 \pm 0,9$ VZV-spezifische CD8+T-Zelle/ 6×10^5 CD4-PBMC (entspricht 1,0 von 2.000.000 CD8+ T-Zellen) erhöht. Abb.3.40. veranschaulicht diesen Sachverhalt graphisch. Nach vier Wochen betrug die SFC der Zosterpatienten $0,4 \pm 1,1$ VZV-spezifische CD8+T-Zelle/ 6×10^5 CD4-PBMC (entspricht 1,0 von 1.500.000 CD8+ T-Zellen) und bei der Kontrollgruppe $0,4 \pm 1,4$ VZV-spezifische CD8+T-Zelle/ 6×10^5 CD4-PBMC (entspricht 1,0 von 1.500.000 CD8+ T-Zellen). Es war zu diesem Messzeitpunkt kein signifikanter Unterschied messbar. Nach sechs Monaten waren bei den Zosterpatienten $0,04 \pm 0,1$ VZV-spezifische CD8+T-Zelle/ 6×10^5 CD4-PBMC messbar.

Verlauf der VZV-spezifischen T-Zellen der Zoster-Patienten zu Zosterbeginn im Vergleich zu vier Wochen und nach sechs Monaten

VZV-spezifische CD4+ T-Zellen

Im Vergleich zwischen den drei Messzeitpunkten zeigte sich bei den Zoster-Patienten bei den VZV-spezifischen CD4+ T-Zellen zwischen der ersten und letzten Messung eine signifikante ($p = 0.046$) Senkung der Zellzahlen im Verlauf. Zum akuten Zoster-Beginn betrug die SFC $3,0 \pm 5,3$ VZV-spezifische CD4+T-Zelle/ 6×10^5 CD8-PBMC (entspricht 1,0 von 200.000 CD4+ T-Zellen), um dann nach vier Wochen auf $0,7 \pm 3,4$ VZV-spezifische CD4+T-Zelle/ 6×10^5 CD8-PBMC (entspricht 1,0 von 857.143 CD4+ T-Zellen) zu sinken. Nach sechs Monaten waren die Messwerte weiter auf $0,1 \pm 0,2$ VZV-spezifische CD4+T-Zelle/ 6×10^5 CD8-PBMC (entspricht 1,0 von 6000.000 CD4+ T-Zellen) gesunken (Abb.3.41.).

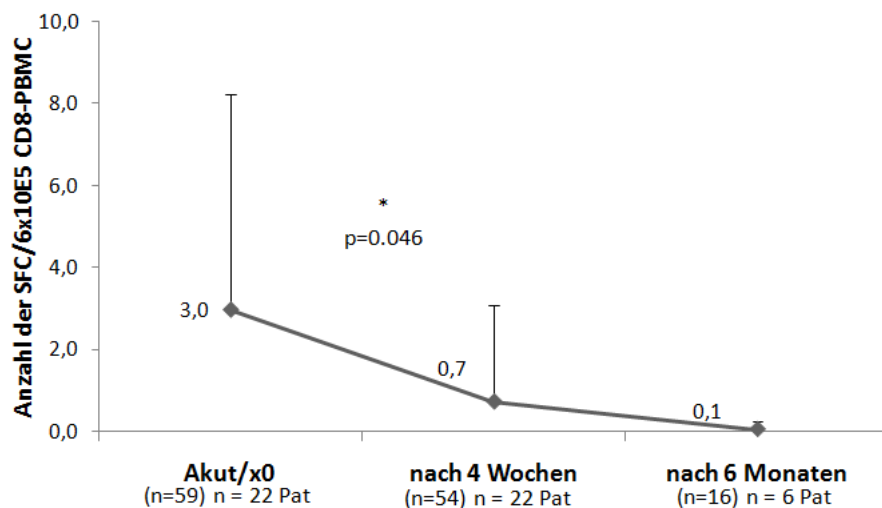


Abbildung 3.41: **Zoster-Patient.** Es zeigt sich eine signifikante Erniedrigung der VZV-spezifischen CD4+ T-Zellen zwischen dem Zeitpunkt der akuten Erkrankung und nach vier Wochen.

VZV-spezifische CD8+ T-Zellen

Auch die VZV-spezifischen CD8+ T-Zellen zeigten bei den Zoster-Patienten im Verlauf signifikante Unterschiede. Zum ersten Messzeitpunkt betrug die Anzahl der SFC $1,5 \pm 2,9$ VZV-spezifische CD8+T-Zelle/ 6×10^5 CD4-PBMC (entspricht 1,0 von 400.000 CD8+ T-Zellen) und nach vier Wochen konnten sinkende Messwerte mit $0,4 \pm 1,1$ VZV-spezifische CD8+T-Zelle/ 6×10^5 CD4-PBMC (entspricht 1,0 von 1.500.000 CD8+ T-Zellen) festgestellt werden. Im Vergleich waren diese Werte mit $p = 0.006$ sehr signifikant. Bei der Betrachtung nach sechs Monaten fällt die Anzahl der VZV-spezifischen CD8+ T-Zellen weiter auf $0,04 \pm 0,2$ VZV-spezifische CD8+T-Zelle/ 6×10^5 CD4-PBMC ab. Dieser Zusammenhang ist in Abb.3.42. veranschaulicht.

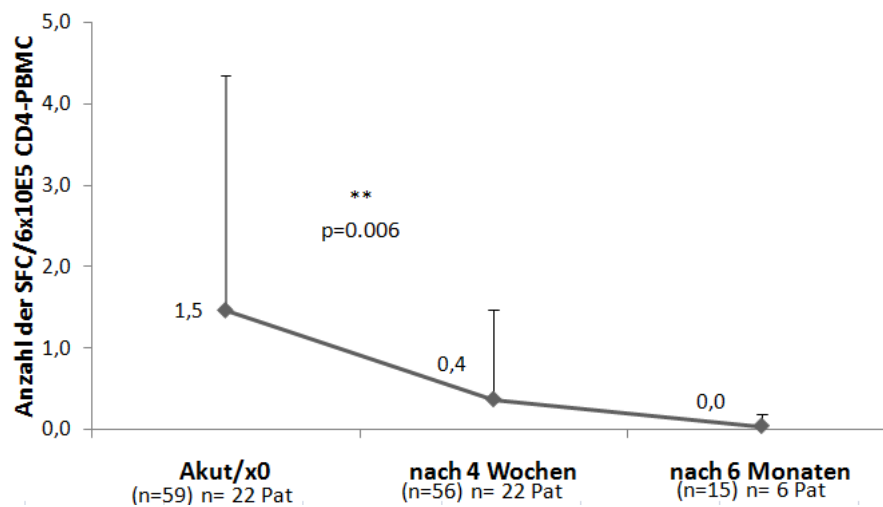


Abbildung 3.42: **Zoster-Patient.** Bei der Betrachtung zwischen dem ersten und zweiten Messzeitpunkt konnte eine sehr signifikante Erniedrigung der VZV-spezifischen CD8+ T-Zellen gemessen werden.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Allgemeine Aspekte

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob ein Abfall der spezifischen zellulären Immunität von Patienten mit einem akuten Herpes Zoster im Vergleich zu Varicella-Zoster Virus-seropositiven Kontrollpatienten gemessen werden kann. Weiter soll geprüft werden, ob der ELISPOT-Assay eine Nachweismethode ist, um die VZV-spezifischen T-Zellen bei Zoster-Patienten zu messen. Es sollen Betrachtungen erfolgen, wie der ELISPOT-Assay in der hier angewandten Analyse verbessert oder vereinfacht werden kann.

Weiter soll herausgestellt werden, welche Prädispositionen sich bei Patienten für die Manifestation eines Herpes Zoster finden. Es soll untersucht werden, ob hieraus die Ursache für die Reaktivierung des Varicella-Zoster Virus gezogen werden kann.

Zur Untersuchung der zellulären Immunität stehen verschiedene Labormethoden zur Verfügung, diese sind in 1.2. vorgestellt. Warum gerade der ELISPOT-Assay für diese Arbeit ausgewählt wurde, ist im Kapitel 1.2.1. dargestellt. Unter 4.1.2. werden noch einmal Vor- und Nachteile herausgestellt und auf die in 2.2. erläuterte Durchführung des ELISPOT-Assay wird Bezug genommen.

4.1.1 Aspekte zur Auswahl der Studienpatienten und des Studiendesigns

Das Patientenkollektiv wurde nach den Kriterien, die in 2.1.1. aufgeführt sind, ausgewählt.

Kennzeichnend für die Studienpatienten als ein Ausschlusskriterium ist eine a priori Beeinflussung des Immunsystems durch bestimmte Erkrankungen oder auch immunsuppressive Therapien. Der Einfluss auf das Immunsystem durch Immunsuppression und Immunmodulation spiegelt sich in vielen wissenschaftlichen Arbeiten wieder (Kaspar, 1968; Khvedelidze et al., 2008).

Wieso kommt es zur Immunsuppression beim älteren Menschen und damit zur Erkrankung eines Herpes Zoster?

Wie in Kapitel 1.4. vorgestellt, geht Arvin et al. (Arvin, 2005) von einer deutlichen Abnahme der spezifischen zellulären Immunität im Alter aus, womit die Reaktivierung des Varicella-Zoster Virus erklärt wird. Zahlreiche Autoren belegen die Abnahme der zellulären Immunität im Alter (Utsuyama et al., 1992; Hirokawa et al., 1992). Rink et al. erklären in ihrer Übersichtsarbeit die zwei Hauptunterschiede im Immunsystem zwischen jungen Patienten und älteren Patienten. Es zeigen sich im Vergleich veränderte Lymphozyten-Subpopulationen und eine Dysfunktion der einzelnen Subpopulationen. Rink et. al. zeigen an mehreren Arbeiten, dass gerade im Alter die γ -Interferon Sekretion stark dezimiert ist. Lymphozyten von jungen Probanden sezernieren γ -Interferon schneller und in höheren Mengen als Lymphozyten von älteren Personen (Rink et al., 1998). Da in dieser Arbeit ausschließlich ältere Probanden untersucht wurden, kann durch die verminderte γ -Interferon Sekretion ein Einfluss im ELISPOT-Assay nicht ausgeschlossen werden (Ouyang et al., 2002). Ist die γ -Interferon Sekretion nach Antigenkontakt bei älteren Patienten vermindert, könnte dies eine Ursache der geringen Anzahl von SFC sein.

In den Kapiteln 4.2.-4.8. wird zu den zu den anamnestisch erhobenen Daten anhand des Aktenstudiums und der Untersuchungsbögen, sowie der gemessenen Daten im Immunstatus, des Blutbildes, der Serologie und des ELISPOT-Assays in dieser Arbeit Stellung bezogen.

VZV-seropositive Kontrollpersonen

In diesem Kontext muss trotz gewissenhafter Auswahl der Studienpatienten kritisch angemerkt werden, dass nahezu alle Kontrollpatienten aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität Rostock akquiriert wurden. Es wurde somit eine Kontrollgruppe gewählt, die so sehr durch eine dermatologische Krankheit gezeichnet ist, dass die Indikation zur stationären Behandlung ärztlicherseits gestellt wurde. Daher ist keine repräsentative Kontrollgruppe der normalen Durchschnittsbevölkerung gegeben.

Um weitere Fehlerquellen auszuschließen, wurde darauf geachtet, dass die VZV-seropositiven Kontrollpatienten zu den zu untersuchenden Patienten mit einem akutem Herpes Zoster nur eine maximale Altersdifferenz von fünf Jahren aufweisen und weiterhin ein entsprechend ähnliches Krankheitsprofil (arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Herzinsuffizienz, etc.) enthielten. So wurde eine möglichst große Kongruenz zwischen den beiden Studiengruppen geschaffen. Zur Auswertung der Anamnese der untersuchten Patienten sei auf Kapitel 4.3. verwiesen.

Zoster-Patienten

Die Ursachen der Immunsuppression und damit den Einfluss der zellulären Immunität auf die Manifestation eines Herpes Zoster konnten nicht untersucht werden, da die Patienten zum Zeitpunkt der akuten Herpes Zoster-Erkrankung ausgewählt wurden. Das heißt also, die Patienten wurden nicht vor dem Beginn der Erkrankung erfasst, sondern nach der Manifestation. Es konnte nicht verhindert werden, dass auch Patienten eingeschlossen wurden, bei denen anamnestisch der Herpes Zoster mit unspezifischen Symptomen seit mehreren Tagen bestand. In der Regel wurden die Patienten jedoch bei Hautmanifestation mit Pustulae und Erythem vorgestellt. Es ist also anzunehmen, dass die vorgestellten

Ergebnisse entweder auf einer vor der Erkrankung bestehenden Immunsuppression beruhen oder aber die dargestellte Immunsuppression Folge der Erkrankung Herpes Zoster ist. Damit kann das Ziel dieser Arbeit, ob ein Abfall der spezifischen zellulären Immunität bei diesen Zosterpatienten gemessen werden kann, verfolgt werden. Die vollständige Diskussion des Immunstatus erfolgt in Kapitel 4.4.

Studiendesign

Aufgrund der dargelegten Gründe, wäre diese Arbeit also idealerweise als eine prospektive Langzeitstudie einer gesunden Altersgruppe > 50 Jahre angelegt worden. Die hier dargestellten Laboruntersuchungen wären direkt bei der Manifestation eines Herpes Zoster in der Prodromalphase noch vor Ausbruch des makulo-pustulösen Exanthem ausgeführt worden. Aus Gründen der Praktikabilität, Ethik und Wirtschaftlichkeit ist eine solche Studie kaum durchzuführen. Es kann daher nur eine Studie zum frühen Erkrankungszeitpunkt, wie in dieser Arbeit, erfolgen.

4.1.2 Aspekte zur Methode des ELISPOT-Assay

Protokoll Um einen effizienten ELISPOT-Assay durchzuführen, werden nach (Janetzki et al., 2005) neben dem richtigen Material und der routinierten Durchführung drei Optimierungen benannt. Die Blutentnahme, die PBMC Separation und die Kryokonservierung. Eine Blutentnahme (EDTA-Vollblut) und die schnelle Weiterverarbeitung des peripheren Venenblutes innerhalb von acht Stunden wird empfohlen. In dieser Arbeit wurden die Blutproben sofort auf Kühl-schranktemperatur gekühlt und innerhalb von vier Stunden erfolgte die PBMC-Isolierung. Die PBMC-Isolierung wurde, wie mit dem von Janetzki et. al. propagierten Ficoll-Gradient separiert. Der Ficoll-Gradient hat sich etabliert. Als letzte Optimierungsmaßnahme wird die Kryokonservierung genannt, die manuell, mit einem Nalgene Cryo 1C Freezing Container ("Mr. Frosty Nalgene") oder automatisch erfolgen kann (Janetzki et al., 2005).

Smith et. al. beschreibt das weiter, dass das System der Zellkultur, das enzym-vermittelter Erfassungssystem und die Techniken der Spotzählung zu einem suffizienten ELISPOT-Assay führen (Smith et al., 2001). Diese technischen Voraussetzungen sind modifiziert in Abbildung 4.1. veranschaulicht.

Zellverlust Als wesentlicher kritischer Schritt der zum Zellverlust führt, wird die Kryokonservierung angesehen. Um eine optimale Konservierung der isolierten Zellen zu erreichen, sollen diese langsam herunter gekühlt werden. Dafür können DMSO und Mr. Frosty Nalgene verwendet werden (Janetzki et al., 2005). Diese Methodik wurde ebenfalls in dieser Arbeit angewendet.

Die Arbeitsgruppe um Smith. et. al. suchte nach weiteren Kriterien, um zell-vermittelte Assays mit kryokonservierten Zellen unter bestimmten Konditionen weiter eingrenzen zu können. Dabei wurde die Vitalität und Apoptose der Zellen auf drei Arten gemessen. Die Vitalität wurde durch eine blaue Tryptan Färbung, die frühe Apoptose der Zellen durch den Guava-Annexin-Assay nachgewiesen

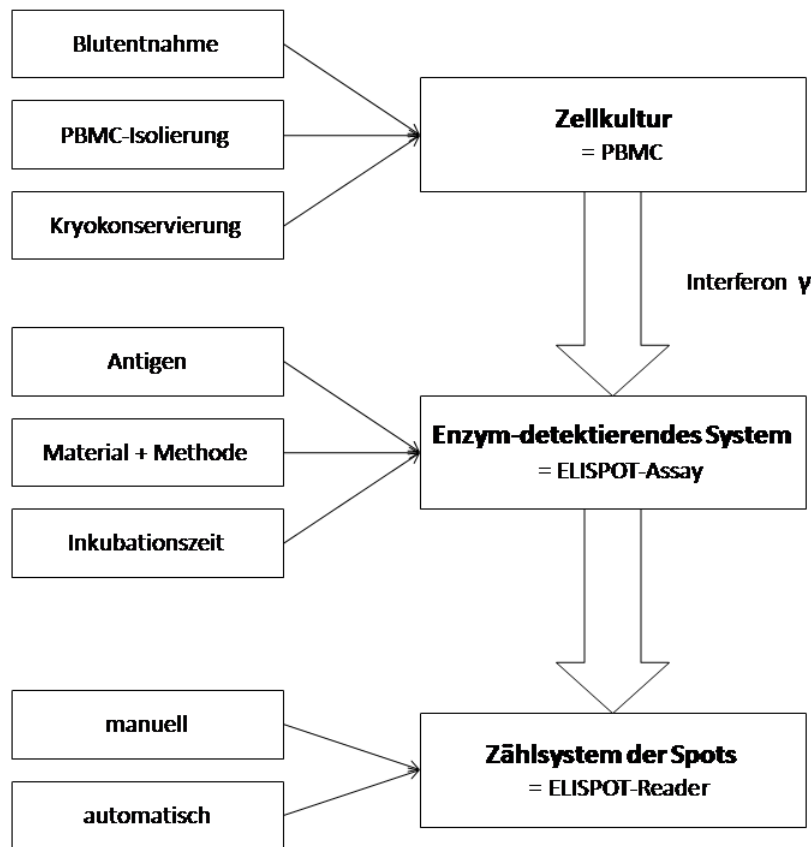


Abbildung 4.1: Voraussetzungen für einen suffizienten ELISPOT-Assay modifiziert nach Smith et. al. (Smith et al., 2001)

und die PHA-Antwort im γ -Interferon-ELISPOT-Assay gemessen. Die Apoptosemessung stellte die effektivste Methode dar, um die Antigenanregung zu messen (Smith et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde bei der Durchführung des ELISPOT-Assays ebenfalls die unspezifische Immunantwort der separierten T-Lymphozyten auf Lectin (hier PHA) gemessen. Da regelhaft SFC nach Inkubation mit PHA gemessen werden konnten (Siehe auch Abbildung 2.11.), ist davon auszugehen, dass die eingesetzten separierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eine funktionstüchtige Immunfunktion haben.

Bei sachgemäßer Durchführung sind keine Unterschiede im ELISPOT-Assay zwischen kryokonservierten und frischen PMBC zu erwarten (Smith et al., 2001). Eine weitere Ursache für den Verlust von Zellen ist die mehrmalige Anwendung einer Zentrifuge (Varisli et al., 2009; Lotfian et al., 2003). Praktisch war diese Anwendung nicht zu vermeiden.

Materialfehler Wie bereits geschildert, zeigte sich bei der Auswertung der ELISPOT-Platten teilweise eine mangelnde Entwicklung der Spots und insbesondere eine Schleierbildung auf den wells. Auf der Suche nach Ursachen kann im Vergleich zu den bisher aufgeführten Arbeiten ein Materialfehler ausgeschlossen werden, da äquivalente Materialien und Reagenzien benutzt wurden (Janetzki et al., 2008). Die in der Literatur gezeigten Artefakte der Spots lassen sich auf eine falsche Materialauswahl, eine zu geringe Antikörperkonzentration und eine fehlerhafte Beschichtung der Platte, sowie eine falsche Waschung der Platten zurückführen (Janetzki et al., 2005). Im folgenden wird als Ursache auf den Einsatz der Antikörper und Antigene, sowie der Zellzahl als mögliche Fehlerursache eingegangen.

Antikörper- und Antigeneinsatz, Zellzahl Für eine effektive Antigen-Antikörperbindung muss u.a. eine optimale Konzentration zwischen Antikörpern, VZV-Antigen und dem sezernierten γ -Interferon erreicht werden. Dieser Sachverhalt spiegelt sich z.B. bei der Präzipitation in der Heidelberger Kurve wieder. In dieser zeigt sich das Maximum der Antigen-Antikörper-Komplexbildung weder bei freien Antigen noch freien Antikörpern. Es kann eine Analogie hergestellt werden, wobei der ELISPOT-Assay mit seinen drei Hauptkomponenten der Immunreaktion ein komplexeres System darstellt.

So beschreibt Smith et. al. eine Konzentration von $2,5\text{-}10\mu\text{g/ml}$ für den Anti-Interferon γ -Antikörper und für den zweiten detektierenden Antikörper eine Konzentration von $0,1\text{-}2,5\mu\text{g/ml}$ (Smith et al., 2001). Eine zu geringe Antikörperkonzentration kann in dieser Arbeit ausgeschlossen werden, da beim ersten Antikörper $10\mu\text{g/ml}$ und beim zweiten Antikörper $2\mu\text{g/ml}$ verwendet wurden.

Das VZV-Antigen wurde bei Smith et. al. mit einer Verdünnung von 1:80 mit den Zellen inkubiert (Smith et al., 2001). Mit der Verwendung von 1:25 ($20\mu\text{l}$ VZV-Antigen auf $500\mu\text{l}$ RPMI/10% HS-Medium) wurde in dieser Arbeit eine wesentlich geringere Konzentration eingesetzt. Sadaoka et al. stellten heraus, dass der beste Effekt bei einer Antigenkonzentration von 3×10^4 pfu/ml (pfu = plaque forming unit) liegt (Sadaoka et al., 2008).

Beim Vergleich zwischen den eingesetzten Zellzahlen ergeben sich weiterhin Unterschiede. So fand Smith et. al. heraus, dass die Anzahl der SFC am Höchsten bei einer Zellzahl von $2 \times 10^5\text{-}6 \times 10^5$ Zellen/well lag (Smith et al., 2001). Sadaoka et al. grenzten die Zellzahl weiter ein, ein Optimum liegt bei 4×10^5 Zellen/well (Sadaoka et al., 2008). Wie in Kapitel 2.2.3. angemerkt, wurde jedoch durch mangelnde Spot-Entwicklung in dieser Arbeit die Zellzahl von 3×10^5 CD8-PBMC bzw. CD4-PBMC/well bis auf maximal 10×10^5 CD8-PBMC bzw. CD4-PBMC/well erhöht. Die hier eingesetzte Zellzahl liegt höher als bei (Smith et al., 2001), liegt aber mit 10 Millionen/well noch in dem von Janetzki et al. angegebenen Bereich der eingesetzten Zellzahlen. Diese Arbeitsgruppe fand heraus, dass eine Zellzahl unter 8 Millionen und über 20 Millionen zu einer falschen Spotanzahl führen kann. Andererseits konnte keine Korrelation zwischen Anzahl der gezählten Zellen und der Anzahl der gezählten Spots gezeigt werden (Janetzki et al., 2008). Hingegen belegt eine andere Arbeit, dass ab einer Konzentration von 6×10^5 Zellen/well eine deutliche Reduktion der Spots festzustellen ist (Sadaoka et al., 2008).

Im Vergleich zur oben genannten Arbeit zeigt sich also ein zu geringer VZV-Antigen Einsatz und zu hoher Zellzahleinsatz, damit könnte die geringe Spot-Anzahl erklärt werden.

Einen weiteren Erklärungsansatz liefert die Arbeitsgruppe um Sadaoka et al. für die geringe Spot-Anzahl. Denn es konnte eine Verminderung der Sensitivität des ELISPOT-Assays mit zunehmendem Alter festgestellt werden (Sadaoka et al., 2008). So war eine deutliche Reduktion der Spotanzahl bei Patienten älter als fünfzig Jahren messbar. Da in dieser Arbeit wesentlich ältere Patienten (siehe Kapitel 4.3. Alter) untersucht wurden, kann somit eine Ursache der geringen Spotanzahl im Alter des untersuchten Patienten-Kollektivs gefunden werden.

Inkubationszeit Als Ursache für die geringe Anzahl der SFC auf das VZV-Antigen kann die Gesamtlänge der Inkubationszeit ausgeschlossen werden. Die Inkubationszeit betrug nach Auftragen des antigendetektierenden Antikörpers am ersten Tag 24 Stunden. Von Tag zwei zu Tag drei, also der Zeit in dem die VZV-spezifischen CD8-PBMC bzw. CD4-PBMC der Patienten mit dem Antigen VZV reagierten, betrug die Inkubationszeit 20 Stunden. In der Literatur wird über eine äquivalente Spotanzahl und auch Qualität der Spots während einer Inkubationszeit von 16-21 Stunden am Tag zwei zu Tag drei berichtet. Darüber hinaus wird kein Anstieg der Anzahl erreicht, sondern die Spots erscheinen und überlappen sich, so dass eine Auswertung erschwert wird (Smith et al., 2001).

Ursache Schleierbildung Die in dieser Arbeit zu bemängelnde Schleierbildung auf den wells wird auf die hohe eingesetzte Zellkonzentration der isolierten Patientenzellen mit bis zu Maximal 10×10^{10} Zellen/well und die hohe Monozytenzellzahl zurückgeführt. Es konnte sich zu dem dargestellten Problem keine vergleichende Literatur finden.

Da in dieser Arbeit die spezifische T-Zellfunktion untersucht werden sollte, fand eine Separation der gewonnenen PBMC in CD4+ und CD8+ Zellen statt. Der Oberflächenmarker CD4 findet sich unter anderem bei T-Zellen, neutrophilen Zellen, Monozyten und Makrophagen (Zola et al., 2007). Es wurden also durch die Selektion mittels MACS-Technik keine reine T-Zellpopulation gewonnen. Also musste eine weitere Eingrenzung durch einen zytokindetektierenden Antikörper erfolgen (Antikörper gegen γ -Interferon). Jedoch können auch Monozyten und Makrophagen durch Zytokine von T-Zellen stimuliert werden, z.B. auch γ -Interferon (Kantari et al., 2008). Das heißt also, dass von T-Lymphozyten sezerniertes γ -Interferon nach Antigenkontakt mit dem Varicella-Zoster Virus Monozyten stimuliert haben könnte. Dadurch wäre eine Schleierbildung erklärbar. Unterstützt wird diese These dadurch, dass bei Patienten mit einem Herpes Zoster eine Dysfunktion der Monozyten festgestellt werden kann (Twomey et al., 1974) und signifikant erhöhte Monozytenzahlen gemessen werden können (im Vergleich zu anderen Erkrankungen ausgelöst durch Herpes-Viridae) (Tsu-kahara et al., 1992).

Zur Verdeutlichung der hohen gemessenen Monozytenwerte sind diese in Tabelle 4.1 dargestellt. Dabei sei darauf hingewiesen, dass der hier angenommene Referenzwert bei 3-5 % Monozyten liegt.

Zeitpunkt	VZV-Patient	Kontroll-Patient
akut	9,8	7,4
nach 4 Wochen	8,1	7,9
nach 6 Monaten	7	12,7

Tabelle 4.1: **Monozyten (Immunstatus) im Verlauf zwischen VZV-Patient und Kontroll-Patient.** Angabe Mittelwert in Prozent

Verbesserung des ELISPOT-Assay

Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Sensitivität stellt eine Vorstimulation der Zellen dar. Godard et al. zeigt dies mit dem Cytomegalie-Virus bei CD8+ T-Lymphozyten (Godard et al., 2004). Während der praktischen Durchführung dieser Arbeit wurde versuchsweise zur Erhöhung der Spotanzahl eine Vorstimulation mit dem VZV-Antigen und IL-2 über fünf Tage durchgeführt. Dabei zeigten sich jedoch keine erhöhten SFC.

Aus den bisher dargestellten Sachverhalten ergeben sich für zukünftige Arbeiten folgende Lösungsansätze:

Praktisch stellte sich die geringe Zellzahl der akut erkrankten Patienten und der hohen benötigten Zellzahl (Siehe Kapitel 3.1.) als Problem dar. Eine auf die Menge bezogene größere Blutentnahme könnte dieses Problem lösen und müsste ethisch geklärt werden.

Es wurde ein Antikörper gegen γ -Interferon sezernierende T-Zellen eingesetzt. Aus einer anderen Arbeit ergibt sich eine hohe Koexpression dieses Zytokins mit Interleukin 2 (IL-2) und dem Tumornekrosefaktor α (TNF α) (Schub et al., 2014; Zhang et al., 2011). Eine Kombination könnte eine Möglichkeit sein, die Sensitivität der VZV-spezifischen T-Zellen im ELISPOT-Assay zu erhöhen.

Jedoch kann mit dem erhöhten Einsatz des Antigens eine erste Strategie verfolgt werden.

Es wird beschrieben, dass eine Zellverklumpung während der Konservierung durch den Einsatz von Endonukleasen, wie Benzonase, verhindert werden kann (Smith et al., 2001). Dieser Ansatz sollte vergleichend mit der in dieser Arbeit verwendeten mechanischen Komponente, dem Cellstrainer 40 μ m Nylon, weiter verfolgt werden. Liegen die Zellen in Clustern zusammen, könnten die Bindungsstellen für Antigene, aber auch für Antigen präsentierende Zellen nicht zur Verfügung stehen und somit die γ -Interferon Ausschüttung der Zellen blockiert werden.

Weiterhin können verschiedene VZV-Antigene miteinander verglichen werden, um herauszustellen mit welchen Antigenen die größte Anzahl von Spots zu erzielen ist. In dieser Arbeit wurde ein KBR-Antigen eingesetzt, dieses ist im Gegensatz zu einem ELISA-Antigen nicht hochgereinigt (Herstelleraussage Viron/serion). Es müsste also eine höhere Anzahl von Spots im ELISPOT-Assay zu erwarten sein, wenn ein ELISA-Antigen eingesetzt wird. Dies ist in weiteren Studien zu klären. Weiterhin können Bulk-Antigene mit den bisher vorgestellten VZV-Antigen verglichen werden. Die Bulk-Antigene VZV-Vollvirus-Antigen und VZV-Glykoproteinantigen werden ebenfalls für den ELISA eingesetzt.

4.2 Aktenstudium

Es sei darauf verwiesen, dass bei der Auswertung der Daten von Patienten mit einem Herpes Zoster nach Aktenlage keine Signifikanzen im Vergleich der Patienten nach dem Jahr der Erkrankung (2006 und 2007), sowie zwischen den Zoster-Patienten und den Studien-Patienten gemessen werden konnten.

Altersklassen Die Erkrankung Herpes Zoster tritt in jedem Alter auf, dennoch ist eine erhöhte Inzidenz mit zunehmendem Alter festzustellen (Insinga et al., 2005).

Schmader et al. vergleicht Arbeiten in verschiedenen Ländern der Erde in Bezug auf die Inzidenz des Herpes Zoster. Ein Vergleich ist durch die methodischen Unterschiede schwierig, dennoch ist zusammenfassend festzustellen, dass die Inzidenz ab dem Alter 50 - 60 Jahre deutlich ansteigt. So kann bei der Gruppe der über 80-jährigen Patienten die höchste Inzidenz gemessen werden (Schmader et al., 2008). Auch andere Autoren bestätigen diese Darstellung (Weinberg, 2007; Gross et al., 2003; Wutzler and Meister, 1997).

In Anlehnung an die hier zitierten Arbeiten konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass bei den untersuchten Patienten die Altersgruppe der 75 - 85-jährigen Probanden am Häufigsten repräsentiert wurde. In die Studie konnten Patienten die ambulant behandelt wurden und unbehandelte Patienten mit einem Herpes Zoster nicht eingeschlossen werden, daher kann anhand dieser Studie keine Aussage zur Inzidenz in der untersuchten Region Rostock getroffen werden.

Geschlecht Aussagen in Bezug auf das Geschlecht sind für das Jahr 2007 auf Grund der geringen Probandenzahl nur begrenzt möglich. Im Jahr 2006 überwiegt die Anzahl des männlichen Geschlechts, im Jahr 2007 die des weiblichen Geschlechts. Es kann in dieser Arbeit somit keine eindeutige Aussage zur Prädisposition in Bezug auf das Geschlecht getroffen werden.

Schmader et al. kommt in einem Review zum selben Ergebnis. So sehen im internationalen Vergleich einige Studien keine Unterschiede zwischen Männern und Frauen, andere hingegen zeigen eine erhöhte Inzidenz für einen Herpes Zoster bei Frauen (Schmader et al., 2008). Wutzler et al. führt die bei einer im Jahr 1994/1995 durchgeführten Studie an über 2000 ambulanten Zoster Patienten in Deutschland gemessene erhöhte Inzidenz bei Frauen auf einen höheren geschlechtsspezifischen Anteil in der Gesamtbevölkerung zurück (Wutzler and Meister, 1997). Der Aspekt der genderspezifischen Einweisungsrate aufgrund der Erkrankung wurde in dieser Studie nicht untersucht, könnte aber eine Ursache für das Geschlechterverhältnis sein.

Dermatome Bei der Betrachtung der Häufigkeit der betroffenen Dermatome fällt ein großer Unterschied zur Literatur auf. Die hier untersuchten Patienten wiesen am Häufigsten eine Lokalisation des Herpes Zoster im Dermatome Trigemini 1 auf. Dies widerspricht deutlich zahlreichen Studien, die die häufigste

Lokalisation in den thorakalen Dermatomen angeben (Meister et al., 1998; Ragozzino et al., 1982; Wutzler and Meister, 1997).

Dies kann damit erklärt werden, dass in der Studie nur stationär therapierte Patienten untersucht wurden. Eine Indikation zur stationären Aufnahme ist bei Patienten mit einem kranio-faszialen Herpes Zoster, Dissemination, Organmanifestation und unbekannter Immunschwäche gegeben (Gross et al., 2003).

Bei der Analyse der Anzahl der betroffenen Dermatome findet sich eine Übereinstimmung mit der Literatur. Meister et. al. beschreibt bei 66 % der Patienten ein betroffenes Dermatom und in 31,2 % der Fälle von zwei betroffenen Dermatomen (Meister et al., 1998). Diese Zahlen variieren nur minimal von denen in dieser Studie untersuchten Patienten (ein Dermatom 61,3 %; zwei Dermatome 25,2 %).

Schmerzskala

Zeitpunkt akut Neben der Hautmanifestation eines Herpes Zoster ist als Hauptsymptom der neuropathische Schmerz anzusehen (Weinberg, 2007; Woolf and Mannion, 1999). Der akute Schmerz korreliert auch mit dem Risiko einer Postzoster-Neuralgie (Wood et al., 1996; Dworkin et al., 1992). Deshalb wird ein Schmerzmonitoring z.B. mittels der Visuellen-Analog-Skala (VAS) bei Patienten mit einem Herpes Zoster angestrebt, um die Therapie evaluieren zu können. Im Jahr 2006 und 2007 gaben 21,1 % der Patienten zum ersten Untersuchungszeitpunkt keine Schmerzen an. Daraus folgt, dass 78,9% der Patienten Schmerzen zum Zeitpunkt der akuten Erkrankung haben. Vergleichend finden sich äquivalente Angaben in der Literatur. 60 % - 90 % der Patienten mit einem Herpes Zoster geben Schmerzen und lokale Sensationen, wie Hypersensitivität an (Weinberg, 2007; Dworkin et al., 2007).

Zeitpunkt nach vier Wochen Eine Postzoster-Neuralgie ist definiert als ein persistierender chronischer Schmerzzustand länger als vier Wochen nach Auftreten eines Herpes Zoster (Wood, 2002). 10 % - 20 % aller Herpes Zoster Patienten erleiden eine Post-Zoster-Neuralgie (Gross et al., 2003). Andere Autoren nennen mit 10 % - 70 % eine weitaus größere Anzahl der betroffenen Patienten (Kost and Straus, 1996). In einer empirischen Studie aus dem Jahr 1994/1995 wurde eine Inzidenz der Post-Zoster-Neuralgie von 28,4 % gemessen (Wutzler and Meister, 1997).

Im Jahr 2006 und 2007 waren bei der Kontrolluntersuchung nach vier Wochen 69 % der Patienten schmerzfrei, das heißt 31 % der Patienten hatten persistierende Schmerzen. Ob in einzelnen Fällen die Diagnose einer Postzoster-Neuralgie gestellt wurde, ist nicht weiter untersucht worden. Auch soll die Therapie einer Postzoster-Neuralgie nicht Gegenstand dieser Diskussion sein. Für weitere Informationen sei auf Johnson et al. verwiesen (Johnson et al., 2008).

Zusammenfassend kann also als Prädisposition für einen Herpes Zoster ein erhöhtes Alter angenommen werden. Prädispositionen durch die Analyse des Krankheitsprofils und das Geschlecht ergaben sich statistisch nicht.

4.3 Untersuchungsbögen

Bei der Auswertung der Untersuchungsbögen ergaben sich keine Signifikanzen (Gruppenvergleich Zosterpatient versus VZV-seropositiver Kontrollpatient, Vergleich Altersklassen, Vergleich Geschlecht). Deshalb wurden in 3.3. die wichtigsten Merkmale tabellarisch aufgeführt, um eine Orientierung über die untersuchten Studienpatienten zu geben.

Alter Im Vergleich zu den Patienten des Aktenstudiums (im Mittel 64,65 Jahre alt) waren die Patienten mit einem akuten Herpes Zoster mit 67,7 Jahre (arithmetischer Mittelwert) älter. Die VZV-seropositiven Kontroll-Patienten waren mit 68,3 Jahre nur unwesentlich älter als die Zoster-Patienten. Daraus kann gefolgert werden, dass die Zosterpatienten des Aktenstudium und Studienpatienten eine ähnliche Altersstruktur haben. Auf die Inzidenz bezogen spiegelt sich in dieser Studie eine Alterspopulation wieder, die auch in der Literatur genannt wird ((Weinberg, 2007; Gross et al., 2003; Wutzler and Meister, 1997; Schmader et al., 2008)).

Dermatome Sowohl die Patienten des Aktenstudiums, als auch die Zosterpatienten der Studie erkrankten am Häufigsten im Bereich der thorakalen Dermatome (40,9%), gefolgt von einer Manifestation im Bereich des Innervationsgebietes des Nervus ophthalmicus (36,4%).

Wie im Aktenstudium dargelegt, zeigen auch die hier untersuchten Patienten die Erkrankung überwiegend in einem Dermatom (59,1%). Bei 13,6% waren zwei Dermatome und bei 18,2% drei Dermatome betroffen. Die Anzahl der Dermatome ist bei den Studien-Patienten also höher als bei den aktenkundigen Patienten. Im Vergleich zeigten sich jedoch keine Signifikanzen.

Schmerzskala Analog zu den aktenkundigen Patienten im Jahr 2006 und 2007 wurden die Studien-Patienten mit einem Herpes Zoster nach ihrem subjektiven Schmerzempfinden zu den drei Untersuchungszeitpunkten befragt.

Zeitpunkt akut 27,3 % der untersuchten Patienten waren schmerzfrei und 22,7% der Patienten gaben Schmerzen mit dem Skalenwert 7 auf der VAS an. Im Vergleich zu den aktenkundigen Patienten (2006: 12,2%, 2007 12,5%) waren also mehr Patienten schmerzfrei. Gaben die Patienten jedoch Schmerzen an, waren diese deutlich höher (Vergleiche Abb. 3.7). Die Einordnung der Patienten mit Schmerzen geht wie auch bei den Patienten des Aktenstudiums mit der Literatur konform (Weinberg, 2007; Dworkin et al., 2007).

Zeitpunkt nach vier Wochen Beim zweiten Untersuchungszeitpunkt waren 54,5% schmerzfrei und rund 21% der Patienten gaben Werte zwischen 4 und 6 auf der VAS an. Damit zeigt sich im Verlauf innerhalb der untersuchten Studien-Patienten eine deutliche Schmerzreduktion und eine Verschiebung zu kleineren Skalenwerten. Im Vergleich zu den Patienten des Aktenstudiums ist

weiterhin festzustellen, dass deutlich mehr Patienten nach vier Wochen keine Schmerzen erlitten (2006: 36,6%, 2007: 25%). Eine Dokumentation liegt nur für die Dosierung der Virustatika und nicht für die Analgetika-Therapie der Zoster Patienten im Jahr 2006 und 2007 vor, so dass keine Rückschlüsse für die Ursache dieser Differenz gezogen werden können. Es soll lediglich eine orientierende Darstellung gegeben werden.

Zeitpunkt nach sechs Monaten Zum letzten Zeitpunkt gaben nur 4,5% der Patienten Schmerzen mit VAS 4 an, das heißt, dass knapp 95% der untersuchten Patienten schmerzfrei waren. Auf Grund der geringen Anzahl teilnehmender Patienten ($n = 6$) kann jedoch keine valide Aussage getroffen werden.

Prodromalphase Standardisiert wurden bei den Patienten mit einem akuten Herpes Zoster Prodromalerscheinungen (Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Fieber, andere Allgemeinbeschwerden, Parästhesien, Pruritus) abgefragt. Nicht alle abgefragten Merkmale sind in Tab. 6.10. und Tab. 6.11. ausgewiesen.

50% der Patienten gaben vermehrte Müdigkeit und Abgeschlagenheit an. 11% Parästhesien und 13% Pruritus. Es liegt also bei ein Viertel der untersuchten Patienten eine Beeinträchtigung des Wohlbefindens durch körperliche Symptome vor. Wutzler et al. zeigt eine ähnliche Symptommanifestation in der Prodromalphase auf. So zeigen 33 % der über 2000 untersuchten Patienten Parästhesien und 44,9 % Abgeschlagenheit (Wutzler and Meister, 1997). In dieser Arbeit kann bei 9 % der Patienten eine erhöhte Körpertemperatur gemessen werden, Wutzler nennt mit 13,6 % eine höhere Anzahl von betroffenen Patienten (Wutzler and Meister, 1997).

Neben Schmerzen und den Hauterscheinungen sind also eine Reduktion des Allgemeinbefindens, Parästhesien und Pruritus als Hauptmanifestationen vorhanden.

Begleitende Erkrankungen Wutzler et al. nennt in seiner Studie als häufigstes Leiden die maligne Erkrankung (5,1 %) (Wutzler and Meister, 1997). Patienten mit einer solchen Erkrankung wurden in dieser Studie ausgeschlossen. Allerdings wiesen anamnestisch 18,2 % der Zoster-Patienten in der Vergangenheit eine neoplastische Erkrankung auf und ebenfalls 5,6 % der VZV-seropositiven Träger.

Bei der Hälfte aller Zoster- Patienten konnte die Diagnose einer arteriellen Hypertonie anamnestisch erhoben werden, wobei diese Diagnose bei den Kontroll-Patienten (38,9 %) weniger oft zu erheben war.

Als weitere häufige Erkrankung nennt Wutzler et al. den Diabetes mellitus (5,0 %). (Wutzler and Meister, 1997). Im Vergleich mit dieser Arbeit fällt auf, dass hier die Patienten mit einem akuten Herpes-Zoster (9,1 %) häufiger betroffen waren, jedoch 16,7 % aller Kontroll-Patienten an einem Diabetes mellitus erkrankt waren. Kritisch angemerkt werden muss, dass Wutzler sich auf den insulinabhängigen Diabetes mellitus bezieht. In den Untersuchungsbögen dieser Arbeit wurde anamnestisch kein Unterschied zwischen einem nichtinsulinabhängigen und insulinabhängigen Diabetes mellitus gemacht. Ragozzino et al. konnten schon 1983 belegen, dass eine Diabetes mellitus kein Risikofaktor für

einen Herpes Zoster ist (Ragozzino et al., 1983).

In der Literatur wird immer wieder der Zusammenhang des Herpes Zoster mit einer Immunsuppression diskutiert (Gebo et al., 2005; Wood et al., 2008; Khera et al., 2009; Peritz et al., 2008; Fuks et al., 2009; Volpi and Stanberry, 2007). In diesem Zusammenhang werden auch andere auslösende Faktoren (u.a. physisches Trauma, psychologischer Stress) genannt, jedoch keine expliziten Erkrankungen wie die hier erläuterten Grunderkrankungen (Schmader et al., 2008).

Zusammenfassend können anhand der Datenerhebung aus den Untersuchungsbögen als Prädisposition für eine Erkrankung an einem Herpes Zoster ein erhöhtes Alter festgestellt werden. Rückschlüsse aus dem Krankheitsprofil der Patienten können nicht als Ursache für die Reaktivierung des Varicella-Zoster Virus geschlossen werden.

4.4 Blutbild und mikroskopische Differenzierung

Die signifikanten Meßwerte wurden in Kapitel 3.5. dargelegt und sollen nun diskutiert werden.

Eosinophile Granulozyten Bei den Patienten mit einem akuten Herpes Zoster konnten im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (VZV-seropositiver Träger) jeweils nach vier Wochen und nach sechs Monaten signifikant erhöhte Werte der eosinophilen Granulozyten gemessen werden. Bei der Betrachtung der Zoster-Patienten fällt eine Zunahme der Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Verlauf auf. Diese Unterschiede innerhalb der Gruppe der Patienten mit einem Herpes Zoster waren jedoch nicht signifikant. Bei der Gruppe der VZV-seropositiven Träger konnte jedoch eine signifikante Abnahme vom ersten Untersuchungszeitpunkt mit $3,3 \pm 3,4$ % auf $1,5 \pm 1,6$ % beim zweiten Untersuchungszeitpunkt nach vier Wochen gemessen werden.

Es fällt weiter auf, dass sich die Mittelwerte der eosinophilen Granulozyten innerhalb der Referenzwerte von < 5 % bewegen. An Hand der statistischen Abweichung lässt sich belegen, dass viele Ausreißer zu beobachten sind und die Werte der eosinophilen Granulozyten sehr inhomogen liegen.

Es lassen sich keine Arbeiten finden, die die eosinophilen Granulozyten bei Patienten mit einem akuten Herpes Zoster untersuchen. Allerdings zeigte sich bei Untersuchungen zu Windpocken, dass in der akuten Phase und in der Genesung erhöhte eosinophile Granulozyten im peripheren Venenblut messbar waren (Lisse et al., 2005). Die erhöhten Werte bei den Zoster-Patienten sind also analog zu einer Windpocken-Erkrankung als Folge der Infektion zu erklären. Warum sich diese Erhöhung erst signifikant nach vier Wochen und nach sechs Monaten zeigt, ist nicht erklärbar. Vermutet werden kann eine verzögerte unspezifische Immunreaktion bei den hier untersuchten älteren Patienten.

Die Funktion der eosinophilen Granulozyten wurde in Kapitel 1.5. erläutert. Es zeigt sich gerade eine Erhöhung der Eosinophilen bei allergischer Genese, Atemwegserkrankungen (Lemiere, 2004) (Caramori et al., 2005) und parasitären Erkrankungen (Mahmoud, 1982). Patienten mit einer akuten Infektion wurden ausgeschlossen, ebenso Patienten mit einer akuten allergischen Erkrankung. Diese Ursachen können also für die Erhöhung der eosinophilen Granulo-

zyten ausgeschlossen werden. Die Erhebung der Anamnese ergab jedoch, dass 4,5 % der Zoster-Patienten unter einer Atemwegserkrankung litten und 11,1 % der Kontroll-Patienten. Damit könnte die Erhöhung der Eosinophilen bei den Kontroll-Patienten erklärt werden.

Die gemessenen Signifikanzen sind zusammenfassend nicht als spezifische Veränderungen bei einem Herpes Zoster zu werten. Unter anderem wird dies dadurch untermauert, dass die Erhöhungen minimal waren und sich innerhalb der Referenzwerte bewegten.

Neutrophile Stabkernige Neutrophile Granulozyten steigen bei akuten Infektionen, insbesondere bei Erkrankungen mit bakterieller Genese (Dale, 2009) an. Allerdings kann auch eine Inflammation von neutrophilen Granulozyten bei viralen Infektionen gefunden werden (McKean et al., 2003). Insbesondere ist eine prozentuale Erhöhung der stabkernigen Granulozyten zu erwarten, da Neutrophile während der Infektion verbraucht werden und Neue nachgebildet werden müssen (Siehe auch Kapitel 1.5.).

Signifikante Erhöhungen der neutrophilen Stabkernigen waren bei den Patienten mit einem Herpes Zoster in der akuten Erkrankungsphase im Vergleich zu den VZV-seropositiven Trägern messbar. Dabei zeigte sich als Ausdruck der akuten unspezifischen Infektabwehr eine annähernd vierfache Erhöhung der Zellpopulation bei den Zoster-Patienten ($10,3 \pm 11,6$ %) gegenüber den Kontroll-Patienten ($2,4 \pm 3,3$ %). Es kann also im Rahmen der Reaktivierung des Varicella-Zoster Virus von einer Linksverschiebung gesprochen werden, da die neutrophilen Granulozyten die Referenzwerte von <8 % überschritten. Man muss jedoch anmerken, dass die hier gemessene Erhöhung bei viraler Genese minimal ist und sich eine große Streuung zeigt.

Bei den VZV-seropositiven Kontroll-Patienten war ein signifikanter Anstieg der neutrophilen Stabkernigen zwischen der ersten Untersuchung ($2,4 \pm 3,3$ %) und der Verlaufsuntersuchung nach vier Wochen ($5,6 \pm 4,9$ %) messbar. Dabei lagen die Messwerte immer in dem angegebenen Referenzwert, so dass keine Linksverschiebung vorliegt. Bei der genauen Analyse zeigt sich als Ursache für die hier gemessene Erhöhung der neutrophilen Stabkernigen das Auftreten von akuten Erkrankungen bei zwei Patienten. Damit ist auch die hohe Standardabweichung zu erklären. Ein Patient war vor der Verlaufsuntersuchung gestürzt und hat eine Diarrhö entwickelt. Ein zweiter Patient war an einer Sinusitis und einem Harnwegsinfekt erkrankt. Mit diesem Hintergrund lässt sich die Erhöhung erklären und sich als natürliche Komplikation bei älteren Menschen deuten.

Bei den Patienten mit einem akuten Herpes Zoster lässt sich eine Verringerung der neutrophilen Stabkernigen im Verlauf feststellen. Dieses Ergebnis ist als Regeneration des Immunsystems zu deuten. Dennoch zeigt sich auch hier, wie bei den Kontrollpatienten bei der ersten Verlaufsuntersuchung, eine große Streuung der Werte (Standardabweichung $\pm 5,34$). Analog kann diese Messung wie bei den VZV-seropositiven Patienten auf neu aufgetretene Erkrankungen zurückgeführt werden (ein Patient mit Sturz und ein Patient mit Pneumonie).

Akute Infektionen wurden a priori bei den Patienten für die Aufnahme in die Studie ausgeschlossen, dennoch lässt sich ein Auftreten von neuen Infektionen bei dieser Alterspopulation nicht vermeiden. Es wurde bereits dargelegt, dass

das Immunsystem bei dieser Population beeinträchtigt ist (Siehe Kapitel 4.4.). Es wurde auf einen Ausschluss der oben genannten Patienten im Verlauf verzichtet, da die neuen Erkrankungen kleinere Allgemeininfekte (nicht antibiotikarelevant, symptomatische Therapie) waren und die Anzahl der untersuchten Patienten dezimiert worden wäre.

Thrombozyten Die gemessenen Signifikanzen lagen innerhalb der Referenzwerte für Thrombozyten ($150-450 \cdot 10^9/l$). Damit kann davon ausgegangen werden, dass die gemessenen Werte klinisch nicht relevant sind.

Es konnte bei den Patienten mit einem akuten Herpes Zoster im Vergleich zwischen dem ersten ($207,1 \pm 79,1 \cdot 10^9/l$) und zweiten ($282,2 \pm 124,5 \cdot 10^9/l$) Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Anstieg der Thrombozytenzahlen gemessen werden. Dabei zeigt sich eine breite Streuung der Messwerte und ein Anstieg innerhalb des genannten Referenzbereichs.

Man kann also nicht von einer Thrombozytopenie bei akutem Herpes Zoster sprechen, die sich im Verlauf regeneriert. Eine Thrombozytopenie durch Knochenmarksuppression ist bei Therapie mit Aciclovir nicht bekannt. Hervorzuheben sind Nebenwirkungen wie Nephro- und Neurotoxizität, die in dieser Arbeit nicht untersucht werden sollten (Adair et al., 1994; Izzedine et al., 2005).

Die hier gemessen erhöhten Werte sind als nicht krankheitsspezifisch und klinisch relevant zu werten.

Lymphozyten Bei der mikroskopischen Differenzierung wird nur die Gesamtzahl der Lymphozyten erfasst und nicht die einzelnen Subpopulationen wie bei dem Immunstatus.

Mit dem Hintergrundwissen der Diskussion des Immunstatus wird eine Abnahme der Lymphozyten zum akuten Zeitpunkt der Zostererkrankung erwartet.

Tatsächlich zeigen sowohl die Zoster-Patienten, als auch die VZV-seropositiven Kontroll-Patienten während der gesamten Untersuchungsdauer Lymphozytenwerte die im Referenzbereich von 20-42 % liegen. Mit Lymphozytenzahlen von $21,9 \pm 15,2\%$ bei der akuten Erkrankung an einem Herpes Zoster und $22,3 \pm 12,1\%$ nach vier Wochen, zeigen sich niedrignormale Werte bei den Zoster-Patienten. Da die Lymphozyten weiter ansteigen, ist zwischen dem akutem Herpes Zoster und der Untersuchung nach sechs Monaten ($28,0 \pm 13,4\%$) eine Signifikanz ($p=0.043$) messbar. Da allerdings nur bei sechs der Zoster-Patienten eine Verlaufsuntersuchung nach sechs Monaten durchgeführt wurde, die Steigerung marginal ist und sich innerhalb der Referenzwerte bewegt, ist sie als klinisch nicht relevant zu werten.

Festzustellen ist eine Differenz der Messergebnisse für die Lymphozytenzahlen bei der FACS-Analyse des Immunstatus (Verminderung der Gesamt - Lymphozyten) und der hier dargestellten Messergebnisse der mikroskopischen Differenzierung durch die Pappenheim-Färbung (niedrignormale Lymphozyten). Diese Unterschiede könnten mit der geringen Sensitivität der mikroskopischen Differenzierung erklärt werden, da diese Untersuchung manuell durchgeführt wird. In einer vergleichenden Untersuchung bei der Analyse zwischen einer automatischen computergestützten Auswertung und der Pappenheim-Färbung für Zellen im Liquor cerebrospinalis zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede

(Boer et al., 2009). Die unterschiedlichen Messergebnisse dieser Arbeit können also nicht hinreichend durch Anwendung unterschiedlicher Messmethoden erklärt werden.

Zusammenfassend wird eine Linksverschiebung, d.h. eine Zunahme der neutrophilen stabkernigen Granulozyten während der akuten Erkrankung an einem Herpes Zoster nicht als Prädisposition für die Manifestation eines Zosters, sondern als Ursache dessen gedeutet. Eine Immunsuppression in Form einer Erniedrigung der Lymphozytenzahlen als Prädisposition der Erkrankung eines Herpes Zoster ist in dieser Arbeit nicht zu belegen, sondern als Folge der Erkrankung zu werten.

4.5 Immunstatus

Diskutiert werden nur signifikante Unterschiede beim Vergleich zwischen den untersuchten Gruppen und innerhalb der untersuchten Gruppen (Ergebnisse siehe Kapitel 3.5.)

Abnahme der zellulären Immunität im Alter

In dieser Studie wurde nicht primär die Immunität einer gesunden Alterspopulation untersucht. Für zukünftige Studien diesbezüglich sei auf das SENIEUR Protokoll (Senior European) verwiesen, in dem Kriterien festgelegt sind, um immunologische Studien in der Geriatrie durchzuführen (Ligthart et al., 1984). Der von Ligthart et al. postulierte Ausschluss von Patienten mit immunsuppressiven Erkrankungen fand in dieser Arbeit ebenfalls Anwendung. Denn bei immunsupprimierten Patienten ist eine verminderte zelluläre Immunität gegenüber dem Varicella Zoster Virus messbar (Gershon and Steinberg, 1979).

Da eine altersbedingte Abnahme der Immunität feststellbar ist (Hulstaert et al., 1994; Reichert et al., 1991; Makinodan and Kay, 1980; Mittler and Lee, 2004), existieren auch altersspezifische Referenzwerte 6.6 (Hannet et al., 1992). Wenn also angenommen wird, dass die ausgewählten VZV-seropositiven Kontroll-Patienten einer repräsentativen Bevölkerungsgruppe entspricht, muss eine Abnahme der zellulären Immunität gemessen werden können.

Utsuyama et al. vergleichen die zelluläre Immunität bei Neugeborenen mit anderen Alterspopulationen. Dabei zeigte sich insbesondere eine Abnahme der CD8+ T-Suppressorzellen und B-Zellen im Alter. Bei der Messung von CD4+ T-Helferzellen und NK-Zellen konnte eine Zunahme dieser Subpopulationen im Alter festgestellt werden (Utsuyama et al., 1992). Nagel et al. hingegen konnten im Altersvergleich feststellen, dass bei alten Menschen prozentual die T-Zellen vermindert sind und absolut die T-Suppressorzellen. Bei den T-Helferzellen konnten keine Unterschiede zwischen jungen und alten Menschen gemessen werden (Nagel et al., 1981).

Durch den Vergleich der altersspezifischen Referenzwerte mit den Messungen dieser Arbeit (VZV-seropositive Kontroll-Gruppe) können folgende Aussagen getroffen werden:

Es findet sich in dieser Arbeit eine deutlich zunehmende Verschiebung der CD4/CD8-Ratio im Verlauf über die drei Zeitpunkte zu Gunsten der CD4+ Zellen. D.h. hier konnte wie bei Utsuyama et al. eine Zunahme der CD4+ T-Helferzellen und eine Abnahme der CD8+ T-Suppressorzellen gemessen werden. Bei dem ersten Untersuchungszeitpunkt zeigten sich normale Werte für T-Suppressorzellen, bei den T-Helferzellen zeigten sich nur für die ersten beiden Untersuchungszeitpunkte erhöhte Werte. Auch in anderen Arbeiten konnte eine Abnahme der T-Suppressorzellen gemessen werden (Ligthart et al., 1986; Nagel et al., 1983).

Messbar war eine Abnahme der B-Zellen im Vergleich mit den altersspezifischen Referenzwerten. Die Aussagen von Utsuyama et al. können hier also verifiziert werden.

Eine Zunahme der NK-Zellen konnte nur für den ersten Untersuchungszeitpunkt gemessen werden, wie es auch in einer anderen Arbeit belegt ist (Ligthart et al., 1986).

In dieser Studie ist zusammenfassend nicht eine generelle Abnahme der Immunität im Alter für die VZV-seropositiven Kontrollpatienten messbar, sondern wie bei Sanosi et al. nur eine andere Gewichtung der einzelnen Subpopulationen (Sanosi et al., 2008). Herausgestellt sei die Funktion der NK-Zellen. So findet sich bei älteren Patienten mit niedrigen Zellzahlen dieser Subpopulation eine erhöhte Sterblichkeit (Solana and Mariani, 2000).

Vergleich zwischen Patienten mit einem Herpes Zoster und VZV-seropositiven Kontroll-Patienten

Zu erwarten ist eine deutliche Beeinflussung des Immunsystems bei der Reaktivierung des Varicella-Zoster Virus, da auch bei anderen Virusinfektionen eine Beeinflussung des Immunsystems messbar ist (Notkins et al., 1970).

In Anlehnung an Arvin et al. (Arvin, 2005) ist zu erwarten, dass bei den hier beobachteten Patienten mit einem akuten Zoster eine deutliche Abnahme der zellulären Immunität messbar sein muss. Nicht verifizierbar ist, ob diese vor der Manifestation oder mit der Manifestation des Herpes Zoster auftritt (Russell et al., 1973). Weinberg nimmt an, dass die zellvermittelte Immunität unter einem kritischen Niveau abnimmt und es dadurch zur Reaktivierung des Herpes Zoster kommt Weinberg (2007). Siehe auch Kapitel 4.1.1.

Wie nach (Baadsgaard et al., 1987) zu erwarten war, war ein signifikanter Unterschied der Gesamtlymphozyten (Absolutzahlen und Prozentzahlen) zwischen den untersuchten Gruppen sowohl zum ersten, als auch zum zweiten Untersuchungszeitpunkt messbar. Eine Normalisierung der primären Suppression der Gesamtlymphozyten zeigt sich wie bei Baadsgaard et al. erst bei der letzten Verlaufsuntersuchung. Auf Grund der geringen Stichprobe der Zoster-Patienten zum dritten Untersuchungszeitpunkt kann hier jedoch keine valide Aussage getroffen werden.

Es wurde schon die besondere Rolle der NK-Zellen und die Zunahme dieser Subpopulation bei der Kontroll-Gruppe hervorgehoben. Beim ersten und auch beim zweiten Untersuchungszeitpunkt werden eine signifikante Erniedrigung der NK-Zellen (CD16+, CD56+) bei den Patienten mit einem akuten Herpes Zoster im Vergleich zu den VZV-seropositiven Kontrollpersonen gemessen.

Virusinfektionen können die Produktion von γ -Interferon durch NK-Zellen und antivirale Mechanismen induzieren (Biron et al., 1999). Damit haben NK-Zellen eine herausragende Stellung bei der Aktivierung der antiviralen Immunität (Biron and Brossay, 2001). Es müsste also erwartet werden, dass bei einer viralen Infektion die NK-Zahlen steigen (Dokun et al., 2001; Bishop et al., 1987). Bei einer primären VZV Infektion im Kindesalter lassen sich sehr hohe Zellzahlen von NK-Zellen messen. Diese werden u.a. für die milde Klinik verantwortlich gemacht (Terada et al., 1996). Cauda et. al. zeigen bei ihren Untersuchungen über den Immunstatus während des akuten Herpes Zoster jedoch eine verminderte Aktivität der NK-Zellen (Cauda et al., 1987). In der Arbeit von Cauda et al. zeigt sich keine quantitative Verminderung der NK-Zellen. Nach 6-14 Tagen zeigte sich eine gesteigerte NK-Zellaktivität, die sich nach 14 Tagen wieder normalisierte. Diese Beobachtungen können auf dem Sachverhalt basieren, dass sich bei einer effektiven T-Zell-Antwort eine Induktion der Inaktivierung der NK-Funktion zeigt (Biron, 1997).

In dieser Studie war eine verringerte Anzahl der NK-Zellen zu messen. Vermutlich ist dieser Umstand auf eine generelle Immunsuppression zurückzuführen, ist doch in dieser Arbeit eine Abnahme aller Subpopulationen in der akuten Phase des Herpes Zoster messbar.

Bei der akuten Reaktivierung des VZV zeigt sich eine signifikante Erniedrigung der absoluten T-Lymphozyten bei den Zoster-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe. Es ist weiter eine signifikante Erniedrigung der T-Suppressorzellen und T-Helferzellen der akut erkrankten Zoster-Patienten im Vergleich zu den VZV-seropositiven Kontrollpatienten gemessen worden. Eine Erniedrigung dieser Zellzahlen konnte auch von Baadsgaard et al. gemessen werden (Baadsgaard et al., 1987). Cauda et al. hingegen konnten eine erniedrigte T-Helferzellzahl und eine erhöhte T-Suppressorzellzahl messen (Cauda et al., 1987). Wie bei Cauda et. al. normalisierten sich auch in dieser Arbeit die Zellzahlen nach der akuten Phase (Cauda et al., 1987). Bei den Untersuchungen dieser Arbeit wurde nach vier Wochen nicht nur eine Normalisierung sichtbar, sondern es wurde eine prozentuale Erhöhung der T-Lymphozyten und den T-Suppressorzellen im peripheren Venenblut messbar.

Festzustellen ist also eine deutliche Suppression der T-Lymphozyten während des akuten Krankheitsbildes, durch den Verbrauch der Zellen bei der virusspezifischen Immunantwort bei den Zoster-Patienten (Szomolanyi-Tsuda et al., 2002). Die Erhöhung der T-Lymphozyten kann auf einen postinfektiösen Booster-Effekt zurückzuführen sein. Die durch die Down-Regulierung der Zellzahlen nach der Effektor Phase konnte auch hier bei den Zosterpatienten zum dritten Untersuchungszeitpunkt gemessen werden (Szomolanyi-Tsuda et al., 2002).

Die signifikante Erniedrigung der T-Helferzellen während der akuten Phase (1. Untersuchungszeitpunkt) und der Verlaufsuntersuchung nach vier Wochen unterstreicht ihre wichtige Funktion in der Th1 (zellvermittelt) und Th2 (Aktivierung der unspezifischen Immunität und B-Zell-Aktivität) Antwort (Szomolanyi-Tsuda et al., 2002).

Zu erklären sind die erniedrigten Werte der CD8+ T-Suppressorzellen in der akuten Phase damit, dass in dieser Phase die antivirale Immunantwort ihre volle Effektivität entfalten muss. Erst im Verlauf, nach vier Wochen und nach sechs Monaten sind erhöhte Zellzahlen messbar. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen nun ihrer Funktion nachkommen, überschießende

Reaktionen der T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen abzumildern.

Die Ursache der verminderten Anzahl (Absolutzahlen) der aktivierten T-Zellen zum ersten Untersuchungszeitpunkt ist analog zu den T-Helferzellen zu begründen. Spiegeln sie doch die T-Zellpopulation wieder, die bei der akuten Phase erst produziert werden muss, um dann Effektor Funktionen zu erfüllen. So zeigt sich im Verlauf bei den Zoster-Patienten eine prozentuale Erhöhung in der akuten Phase und eine progressive Erniedrigung der Zellzahlen nach vier Wochen und nach sechs Monaten.

Das Schaubild 4.2 modifiziert nach Szomolanyi-Tsuda et. al. verdeutlicht noch einmal die antivirale Kinetik der T-Zellen, welche sich auch in dieser Arbeit für den Immunstatus widerspiegelt.

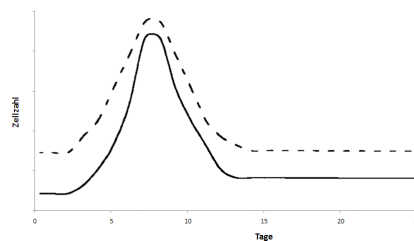


Abbildung 4.2: **Kinetik der T-Zellen bei antiviraler T-Zellantwort.** Die obere unterbrochene Kurve zeigt die Anzahl der absoluten T-Zellen und die untere kontinuierlich gezeichnete Kurve die Anzahl der VZV-spezifischen T-Zellen. Es zeigt sich eine deutliche Erhöhung der T-Zellen während der Virusinfektion. Nach abklingen der Infektion ist im Vergleich zum Ausgangswert eine erhöhte T-Zellzahl zu messen. (Szomolanyi-Tsuda et al., 2002)

Bei der Betrachtung der B-Zellen ist festzustellen, dass in dieser Arbeit wie in anderen Arbeiten auch, eine Dezimierung der absoluten Zahlen dieser Subpopulation in der akuten Phase des Herpes Zoster im Vergleich zur alters- und geschlechtsangepassten VZV-seropositiven Kontrollpersonen messbar war (Baadsgaard et al., 1987). Wie bisher für die T-Zellen angenommen, ist auch für die B-Zellen ein Schwächezustand der Immunität anzunehmen. In weiteren Arbeiten ist zu klären, ob die Suppression des Immunstatus direkte Folge der Krankheit an sich ist oder aber Folge der Immunantwort auf die Infektion (Baadsgaard et al., 1987).

Zusammenfassend kann eine Suppression der Lymphozyten-Subpopulationen (Gesamt-Lymphozyten, CD3+ T-Lymphozyten, CD19+ B-Lymphozyten, CD8+ T-Suppressorzellen, CD4+ T-Helferzellen, CD3+ HLA DR+ aktivierte T-Zellen und der CD16+ CD56+ NK-Zellen) zum ersten Messzeitpunkt bei akut Zoster-Erkrankten im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpatienten gemessen werden. Diese Reduktion der immunologischen Zellen war auch nach vier Wochen noch bei den Gesamt-Lymphozyten, CD3+ T-Lymphozyten, CD8+ T-Suppressorzellen, CD4+ T-Helferzellen und CD16+ CD56+ NK-Zellen bei den Zoster-Patienten nachweisbar (Schaed S.G, 2011). Anhand der Daten kann also bei den Patienten mit einem akuten Herpes Zoster auf eine Immunsuppression geschlossen werden. Eine Prädisposition zur Manifestation eines Herpes Zoster auf Grund einer Immunsuppression kann jedoch nicht unmittelbar abgeleitet

werden.

Weiter sei darauf hingewiesen, dass diese Immunsuppression sich nicht nur auf die zelluläre Ebene auswirkt, sondern auch Auswirkungen auf den akuten Zosterschmerz hat (Higa et al., 1992; Xing et al., 2013). Wie in 1.3. dargelegt, stellt der Schmerz neben den Hauterscheinungen die wesentlichsten Beeinträchtigungen/Komplikationen dar. Somit schließt sich ein Kreis von der zellulären Ebene zum klinischen Erscheinungsbild.

Die Korrelation zwischen der Klinik und des Immunstatus wurden in dieser Arbeit nicht untersucht, könnten aber an Hand der erhobenen Daten in einer neuen Arbeit weiter untersucht werden. Bei keinem der untersuchten 22 Zoster-Patienten wurde nach vier bzw. sechs Monaten die Diagnose einer Post-Zoster-Neuralgie gestellt.

Zeitverlauf innerhalb der Herpes Zoster-Patienten

Signifikante Unterschiede der Lymphozyten-Subpopulationen wurden im Vergleich zwischen den drei Messzeitpunkten für die Zoster-Erkrankten für die absoluten CD8+ T-Suppressorzellen (zwischen Zeitpunkt akut und nach vier Wochen), die prozentualen Zahlen der CD3+ HLA DR+ aktivierten T-Zellen (Zeitpunkt akut - nach vier Wochen, sowie nach vier Wochen - nach sechs Monaten) und der absoluten CD16+ CD56+ NK-Zellen (zwischen Zeitpunkt akut und sechs Monaten) gemessen.

Ein signifikanter Anstieg der CD8+ T-Suppressorzellen zwischen der akuten Zostererkrankung und der Untersuchung nach vier Wochen wurde bereits vorangehend im Gruppenvergleich erörtert. Die akute Erniedrigung spricht für den Verbrauch der T-Zellen in der virusspezifischen Antwort und der Anstieg im Zeitverlauf, für eine Neubildung der Zellen.

Ein prozentualer Anstieg der CD3+ HLA DR+ aktivierten T-Zellen spiegelt sich bei den Zoster-Erkrankten signifikant zwischen den ersten Messzeitpunkten als Ausdruck der Effektor-Funktion in der akuten Virusbekämpfung wieder. Der Anteil dieser Lymphozyten-Subpopulation liegt mit $13,2 \pm 6,03$ % innerhalb des Referenzwertes, muss jedoch insgesamt als Anstieg bewertet werden, da eine Suppression des Immunstatus vorlag. Der signifikante Abfall zwischen den letzten beiden Untersuchungszeitpunkten muss kritisch hinterfragt werden. Da die Anzahl der Stichprobe mit sechs Probanden nach sechs Monaten recht klein war. Die Ergebnisse demonstrieren jedoch, dass die Auseinandersetzung mit dem Virus abgeschlossen ist und sich die Zellzahlen wieder normalisieren. Der prozentuale Anteil der aktivierten T-Zellen bewegte sich mit $5,33 \pm 2,88$ % immer noch unterhalb des Referenzwertes (13-15%).

Der Zeitverlauf für die CD16+, CD56+ NK-Zellen ist kritisch zu hinterfragen. Trotz mehrmaliger statistischer Überprüfung war nur ein signifikanter Anstieg zwischen akutem Krankheitsbeginn ($119,5 \pm 101,2/\mu l$) und der Verlaufsuntersuchung nach sechs Monaten ($175,0 \pm 44,6/\mu l$) messbar, jedoch nicht zwischen ersten und zweiten Messzeitpunkt ($219,5 \pm 228,0/\mu l$). Die Reduktion der CD16+ CD56+ NK-Zellen spiegelt die postulierte Immunsuppression bei akuter Erkrankung (wie bereits im dargestellten Vergleich zwischen den Probandengruppen Zoster-Erkrankte versus VZV-seropositive Kontrollperson) wieder. Es kann nach Rekonvaleszenz der Zoster-Erkrankung anhand der Daten eine reaktive Erhö-

hung gefolgert werden. Zum letzten Zeitpunkt kann geschlossen werden, dass entweder eine Normalisierung der Zellzahlen erfolgt, diese jedoch als Ausdruck der Erkrankung noch immer unterhalb des Referenzwertes liegt. Interessant wäre es in einer folgenden Arbeit, den Zeitverlauf längerfristig zu untersuchen und herauszustellen, ob eine Korrelation zwischen Zoster-Schmerzen und weiter bestehender Immunsuppression besteht.

Zusammenfassend ist bei der Diskussion der Zoster-Patienten in der akuten Krankheitsphase die erniedrigte Lymphozyten-Subpopulation der CD8+ T-Suppressorzellen, als Ausdruck der Immunsuppression zu werten. Die erhöhte Anzahl der CD3+ HLA DR+ aktivierten T-Zellen spiegelt die akute Immunantwort auf das reaktivierte Varicella-Zoster Virus wider. Auf die Bedeutung der erniedrigten Population der CD16+ CD56+ NK-Zellen wurde bereits eingegangen.

4.6 Serologie

Immunglobuline sind Antikörper, die nach einem Antigenkontakt gebildet werden.

Zu erwarten ist also bei einer primären Infektion (Windpocken) ein Anstieg von IgM und IgG gegen das Varicella-Zoster Virus (Arvin et al., 1986). Weiterhin kann gefolgert werden, dass Antikörper gegen eine weitere Infektion schützen (Allison, 1972). Die Antikörperproduktion selbst kann nach einer Virusinfektion vermindert sein, da die Viren B-Zellen infizieren können (Notkins et al., 1970). Unterschiede bei den IgG Titern gegen VZV zwischen jungen und älteren Patienten sind nicht zu erwarten (Hayward and Herberger, 1987).

Immunglobulin M In dieser Arbeit wurde qualitativ gemessen, ob IgM positiv (=1), negativ (=2) oder grenzwertig (=3) ist. Es zeigen sich zum ersten Untersuchungszeitpunkt keine Signifikanzen im Gruppenvergleich. Weiter ist die Messung mit $1,95 \pm 0,22$ bei den Zostererkrankten insgesamt als negativ zu werten. Zu erwarten wäre jedoch ein positiver Nachweis von IgM bei den Zoster-Patienten und ein negativer Nachweis bei den VZV-seropositiven Kontroll-Patienten. IgM und IgG wurden aber nur einmalig bei den Kontroll-Patienten zum zweiten Untersuchungszeitpunkt gemessen, um zu belegen, dass die Kontrollpatienten VZV-seropositiv waren.

Zum Untersuchungszeitpunkt nach vier Wochen zeigt sich jedoch eine Signifikanz ($p=0.022$) für das Immunglobulin M. Es wurde eine 100%ige negative Messung des IgM bei den VZV-seropositiven-Patienten ($2,00 \pm 0,00$) gegenüber den Zoster-Patienten ($1,62 \pm 0,74$) festgestellt. Zu diesem Zeitpunkt wurden 21 Zoster-Patienten untersucht. Bei dreien von ihnen wurde ein grenzwertiger IgM Wert, bei 11 Patienten ein positiver und bei 7 Patienten ein negativer IgM-Wert gemessen.

Man könnte annehmen, dass die VZV-seropositiven Kontrollpatienten auch zum ersten Messzeitpunkt ähnliche Werte wie zum zweiten Messzeitpunkt haben.

Daraus würde ein Vergleich von $1,95 \pm 0,22$ bei den Zoster-Patienten gegenüber $2,00 \pm 0,00$ erfolgen. D.h. zum ersten Messzeitpunkt, also der akuten Zostererkrankung, zeigen in dieser Arbeit sowohl Zoster-Patienten, als auch VZV-seropositive Kontrollpersonen durchweg negative IgM Werte für das Varicella-Zoster Virus. Insgesamt kann also eine verzögerte Immunantwort auf IgM belegt werden. Namazue et. al konnte ebenfalls einen verzögerten Anstieg des IgM bei einem Herpes Zoster, aber einen sehr frühen Anstieg bei der Primärinfektion messen (Namazue et al., 1986).

In anderen Arbeiten wurde belegt, dass ein IgM Anstieg bei Patienten mit akutem Herpes Zoster gemessen werden kann. Wobei die Nachweisbarkeit zwischen 5 % (Arvin and Koropchak, 1980) und 50 % (Gershon et al., 1982) stark schwanken. Bei VZV-seropositiven Frauen konnte ein Anstieg von IgM in 12 % der Fälle gemessen werden, wenn sie mit Windpockenerkrankten Kindern exponiert waren (Arvin et al., 1983). Man kann also folgern, dass der Nachweis als wenig sensitiv einzustufen ist. Gershon et al. belegen, dass die Nachweisbarkeit auch mit dem Nachweisverfahren und dem Zeitpunkt der Bestimmung zusammenhängen. So ist der ELISA nicht das sensitivste Nachweisverfahren. Die Gruppe konnte einen positiven IgM Titer bei 50 % der Patienten ein bis zwei Wochen nach einer Zoster Erkrankung nachweisen (Gershon et al., 1982). Es könnte also vermutet werden, dass die IgM Bestimmung in dieser Arbeit zu früh erfolgte, da sie nicht nach 1-2 Wochen der Zoster-Manifestation, sondern frühzeitig 1-3 Tage nach Bläscheneruption erfolgte. Darin könnte ein Grund für die Messergebnisse zum ersten Untersuchungszeitpunkt liegen.

Immunglobulin G Bei der Auswertung des Immunglobulin G fällt auf, dass zum Untersuchungszeitpunkt nach vier Wochen die Titer der Patienten mit einem Herpes Zoster ($n=21$) hoch signifikant ($p=0.001$) gegenüber den Kontroll-Patienten ($n=16$) erhöht sind. Daraus kann auf einen Booster-Effekt nach einer Reaktivierung des Varicella-Zoster Virus geschlossen werden (Doerr et al., 1987; Arvin et al., 1983). Eine Messung der Immunglobuline G fand nur bei einem VZV-seropositiven Kontrollpatienten zum ersten Untersuchungszeitpunkt statt, also können nur Signifikanzen zwischen den Gruppen zur zweiten Untersuchung messbar sein.

Beim Zeitverlauf der Titer für IgG bei den Zoster-Patienten zwischen der Manifestation des akuten Zoster und nach vier Wochen zeigten sich eine hoch signifikante Erhöhung ($p=0.001$). Nach sechs Monaten fällt der erhöhte Titer langsam ab, so dass zwischen diesem Messzeitpunkt und der vierten Woche signifikant erniedrigte IgG Titer messbar sind ($p=0.042$). Der Titer für das Varicella-Zoster Virus ist mit $2.563,4 \pm 976,3$ ml/Uml immer noch deutlich gegenüber den einmalig gemessenen Titern der VZV-positiven Träger ($1.166,0 \pm 906,7$ mlU/ml) erhöht. Man kann also anhand der hier erhobenen Daten davon ausgehen, dass die Reaktivierung des Herpes Zoster zu einem Booster-Effekt führten, langfristig zu einer erhöhten humoralen Immunität gegenüber dem Varicella-Zoster Virus führt und dabei altersunabhängig ist.

Die Abbildung 4.3 zeigt zusammenfassend die messbaren Antikörper nach VZV-Kontakt über die Zeit.

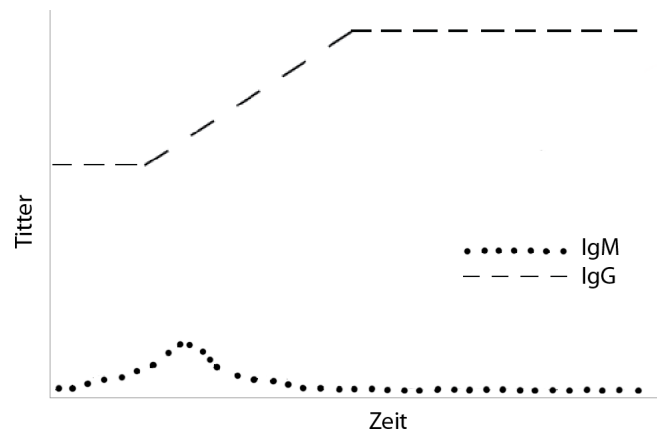


Abbildung 4.3: **Verlauf Antikörper bei Herpesviridae nach immunologischer Reaktivierung.** Aufgetragen ist der Titerverlauf über die Zeit für IgM und IgG. (modifiziert nach Produktinformation SERION ELISA)

4.7 ELISPOT-Assay

Die zelluläre Immunität scheint der effektivste Abwehrmechanismus gegen das Varicella-Zoster Virus zu sein (Allison, 1972; Arvin, 2008). Vermutlich manifestiert sich die Primärinfektion mit dem Varicella-Zoster Virus, den Windpocken, klinisch um so milder, je höher sich die VZV spezifische Immunität ausbildet (Arvin et al., 1986). Ist weiterhin bei einem älteren Menschen die VZV spezifische Immunität hoch, ist die Prädisposition für den Herpes Zoster gering (Hayward and Herberger, 1987).

Nach Antigenkontakt mit einem Virus kann γ -Interferon sezerniert werden (Wheelock, 1965). Also muss auch γ -Interferon nach Kontakt mit dem Varicella-Zoster Virus freigesetzt werden (Yu et al., 2005; Jenkins et al., 1998). Dieses γ -Interferon kann im ELISPOT-Assay gemessen werden (Smith et al., 2001; Distler et al., 2008), welches von aktivierten Th1-Lymphozyten und NK-Zellen sezerniert wird (Dorman and Holland, 2000). Bei kurzer Inkubationszeit mit dem VZV-Antigen stellte sich im IFN- γ Secretion Assay (ISA) heraus, dass NK-Zellen in der Mehrzahl γ -Interferon sezernierte. Bei einer fünftägigen Inkubation hingegen wurde γ -Interferon mehrheitlich von T-Zellen sezerniert (Desombere et al., 2005). Da in dieser Arbeit nur die Sekretion von γ -Interferon der T-Zellen untersucht werden sollte, wurde eine MACS-Separation durchgeführt. Es wurde also nur die Zytokin-Sekretion von CD4+ T-Helferzellen und CD8+ zytotoxischen T-Zellen untersucht (Zola et al., 2007).

Wenn die zelluläre Immunität bei der Erkrankung Herpes Zoster vermindert ist (siehe Kapitel 4.4.), ist dann der ELISPOT-Assay eine Nachweismethode, um VZV-spezifische T-Zellen bei Zoster-Patienten zu messen und kann ein Abfall der spezifischen zellulären Immunität bei Zoster-Patienten mittels ELISPOT-Assay gemessen werden?

Beim Vergleich zwischen jungen und älteren Patienten mit der Intracellular

Cytokin Detektion (ICC) findet sich eine deutliche Reduktion der VZV-spezifischen T-Zellen und eine stark verringerte γ -Interferon Sekretion. Nach einer Impfung mit einer hohen Dosis VZV Oka strain, zeigte sich eine erhöhte Proliferation von spezifischen T-Zellen und eine erhöhte γ -Interferon Sekretion (Asanuma et al., 2000). Auch Ito et al. konnten einen Anstieg der spezifischen T-Zellen nach der Inkubation von PBMC mit VZV-Antigen beobachten (Ito et al., 1992).

Wenn man annimmt, dass eine Reaktivierung des Varicella-Zoster Virus zu einem Herpes Zoster führt und wie eine Impfung zu einem Booster Effekt führt, ist also eine erhöhte VZV-spezifische zelluläre Immunantwort messbar (Arvin, 2005; Levin et al., 2008).

Wie in Kapitel 3.7. dargestellt, wurde in dieser Arbeit der Beweis erbracht, dass der ELISPOT-Assay eine Nachweismethode für die VZV-spezifische T-Zellen bei Zoster-Patienten ist. Allerdings müssen mehrere Punkte weiter diskutiert werden. Eine wesentliche Fehlerursache in dieser Arbeit liegt in dem zu niedrigen Antigeneinsatz, sowie in dem Einsatz von KBR-Antigenen. Aufgrund der Materialauswahl eines KBR-Kontrollantigens könnte auch der positive Nachweis einer VZV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellreaktion bei den Studienpatienten erklärt werden. Auf Rückfrage bei der produzierenden Herstellerfirma Virion/Serion GmbH erscheint es nicht ungewöhnlich, dass im ELISPOT-Assay diese Reaktion auftrat, da es sich um Zellmaterial handelt. Die Ergebnisse der VZV-spezifischen CD4+ oder CD8+ T-Zellen auf das Varicella-Zoster-Virus (Antigen) sind also kritisch zu hinterfragen. Daher sollte durch weitere Untersuchungen angestrebt werden, ob die hier etablierte Nachweismethode reproduzierbar ist.

Werden die SFC in Relation gesetzt, dann dominieren in absteigender Anzahl der gemessenen SFC sowohl für CD4+, als auch für CD8+ T-Zellen zum akuten Zeitpunkt bei allen Studienpatienten PHA, VZV-Antigen und das Kontroll-Antigen. Daher lässt sich folgern, dass die eingesetzten T-Zellen funktionstüchtig waren und eine regelhafte T-Zellreaktion im etablierten ELISPOT-Assay (Reaktion auf PHA) messbar war. In Anlehnung an Levin et al. findet sich in der Literatur der Vorschlag einen ELISPOT-Assay nur als valide gelten zu lassen, wenn mehr als 500 PHA-stimulierte SFCs/ 10^6 PBMC messbar waren (Weinberg et al., 2009). Diese Validierung fand in dieser Arbeit hier nicht statt, da teilweise VZV-spezifische SFCs messbar waren, jedoch keine PHA, sowie SFCs auf PHA, jedoch nicht auf das VZV-Antigen.

Insgesamt ist die Anzahl der SFC nach VZV-Antigeneinsatz im Verhältnis zu den SFC nach PHA zu gering. Daher könnte eine Unterscheidung in Responder- und Non-Responder in Anlehnung an (Lewis et al., 2000) erfolgen. In dieser Arbeit wurde an Hand der statistischen Berechnungen eine Zunahme von 12 spots als positive Antwort (Responder) nach Impfung im Vergleich zwischen Gesunden und Kranken gewählt. M. Niemer schlägt in ihren Untersuchungen mittels ELISPOT-Assay zu allergenspezifischen T-Zellen ein Cut-Off vor, in dem der Mittelwert der Spots der Kontrollgruppe mit der zweiten Standardabweichung addiert wird (Niemer, 2014). Wird dieses Kriterium in dieser Arbeit angewendet, müssten bei den 22 Zoster-Patienten zum akuten Zeitpunkt z.B. für die VZV-spezifischen CD8 + T-Zellen nach VZV-Antigenkontakt (bei insgesamt 21 SFC $> 0,0$; bei maximaler Dreifachbestimmung) bei einem Cut-Off von ≥ 2 SFC neun Patienten als Responder und dreizehn als Non-Responder gewertet wer-

den (bei insgesamt 15 $SFC \geq 2$). Analog ergibt sich hieraus für das angewandte Kriterium des beschriebenen Cut-Off eine veränderte Statistik, die in Tabelle 4.2 dargestellt ist. Dabei muss anhand von (Niemer, 2014) ein SFC unterhalb des Cut-Off bei den Zoster-Patienten und den VZV-seropositiven Kontroll-Patienten gleich 0,0 gewertet. Die Datenlage ist also deutlich dezimiert.

	Zoster-Patient	VZV-seropositiver Kontroll-Patient	Cut-Off
akut/x0 VZV-Antigen CD4+	2,79 $\pm$ 5,34 (n=10)	0,17 $\pm$ 0,87 (n=2)	1,97
akut/x0 VZV-Antigen CD8+	1,34 $\pm$ 2,92 (n=9)	0,22 $\pm$ 0,85 (n=2)	2,00
akut/x0 Lektin CD4+	7,56 $\pm$ 30,38 (n=2)	7,17 $\pm$ 24,29 (n=3)	65,98
akut/x0 Lektin CD8+	2,34 $\pm$ 8,94 (n=3)	1,26 $\pm$ 5,98 (n=1)	16,85

Tabelle 4.2: Darstellung der VZV-spezifischen $SFC/6 \times 10^5$ PBMC in Mittelwerten mit STABW, sowie Anzahl der Responder nach Anwendung des Cut-Off für das VZV-Antigen und Lektin bei den VZV-spezifischen CD4+ und VZV-spezifischen CD8+ T-Zellen zum ersten Untersuchungszeitpunkt akut/x0.

Die Anwendung des dargestellten Cut-Offs läßt keine statistische Aussage mehr zu, da mehr Non-Responder als Responder gemessen werden und die Stichprobe zu klein ist.

Würde eine einfache Unterteilung in Responder- und Nonresponder nach generellem Auftreten von Spots (Non-Responder = keine SFC, Responder = SFC zählbar) erfolgen, ergäbe sich daraus für die untersuchten Zoster-Patienten zum ersten Messzeitpunkt für die VZV-spezifischen CD4+ T-Zellen 7 Non-Responder (Null Spots) und 15 Responder (Patienten mit Spots). Ähnliche Ergebnisse sind für die VZV-spezifischen CD8+ T-Zellen bei akuter Zostererkrankung zu sehen (Zoster-Patient: 10 Responder und 12 Non-Responder). Eine solch einfache Unterteilung erscheint jedoch nicht valide, da diese Non-Responder nach Separation in VZV-spezifische CD4+ und CD8+ teilweise sehr gute PHA-Spots zeigten (Siehe Graphik oben). Daher ist die Hauptursache der teilweise mangelhaften Abbildung für die VZV-spezifischen T-Zellen in den bereits genannten praktischen Ursachen der Durchführung des ELISPOT-Assays zu suchen.

Messergebnis VZV-spezifische CD4+ und CD 8+ T-Zellen Die hochsignifikante Erhöhung ($p=0.001$) der VZV-spezifischen CD4+ T-Zellen bei den Zoster-Patienten zum Zeitpunkt der akuten Erkrankung im Vergleich zu den Kontroll-Patienten, ist mit einer endogenen Reaktivierung erklärbar (siehe Kapitel 1.5.) Diese Erhöhung war auch noch vier Wochen nach der akuten Erkran-

kung messbar, was für eine starke Immunantwort spricht.

Es zeigte sich jedoch nicht nur eine Zunahme der T-Helferzellen, sondern auch für die CD8+ T-Zellen konnte eine sehr signifikante Erhöhung ($p=0.003$) für die Patienten mit einem akuten Herpes Zoster gemessen werden. Die zytotoxischen T-Zellen können virusinfizierte Zellen erkennen und lysieren (siehe Kapitel 1.5). Der Herpes Zoster ist eine Reaktivierung des Varicella-Zoster Virus und damit bestehen nach abgeschlossener primärer Infektion Gedächtniszellen. Bei einer Reaktivierung des VZV und damit Erkrankung an einem Herpes Zoster, werden neben B-Zellen auch T-Zellen reaktiviert. Die Zellzahlen der CD4+ und CD8+ T-Zellen müssen also ansteigen. Dieser Anstieg ist in dieser Studie messbar.

Anhand der Messergebnisse mittels ELISPOT-Assay zeigt sich bei den Zoster-Patienten eine signifikante Abnahme der T-Helferzellen zwischen der akuten Erkrankung und der Verlaufsuntersuchung nach vier Wochen. Die gemessenen Mittelwerte der CD4+VZV-spezifischen Immunität entsprechen zum dritten Zeitpunkt ($0,1 \pm 0,2$ VZV spezifische CD4+T-Zelle/ 6×10^5 CD8-PBMC) ungefähr den gemessenen Werten der VZV-seropositiven Patienten zum ersten Untersuchungszeitpunkt ($0,2 \pm 0,9$ VZV spezifische CD4+T-Zelle/ 6×10^5 CD8-PBMC). Man kann also von einem akuten Booster-Effekt ausgehen, der nach einem halben Jahr in der zellulären Immunität nicht mehr messbar ist (Schub et al., 2014; Weinberg et al., 2009).

Bei dem Vergleich der Messwerte für die zytotoxischen T-Zellen der Zoster-Patienten zeigt sich analog zu den T-Helferzellen eine Abnahme der Zellzahlen über den Verlauf. Eine sehr signifikante Abnahme war zwischen dem ersten und zweiten Messzeitpunkt eruierbar.

Die Zellzahlen der zytotoxischen T-Zellen (nach vier Wochen) normalisieren sich also schneller als bei den T-Helferzellen (nach sechs Monaten). Eine Aktivierung der CD8+T-Zellen ist weiterhin nicht so stark zu beobachten, wie bei den CD4+T-Zellen. So waren die CD4+T-Zellen mit $3,0 \pm 5,3$ VZV spezifische CD4+T-Zelle/ 6×10^5 CD8-PBMC zum akuten Krankheitsbeginn deutlich gegenüber den CD8+T-Zellen mit $1,5 \pm 2,9$ VZV spezifische CD8+T-Zelle/ 6×10^5 CD4-PBMC erhöht. Ein statistischer Vergleich zeigt sich nicht an, da die Zellen unterschiedlicher Morphologie sind und unterschiedliche Funktionen haben. Dennoch unterstreicht dieser Vergleich, die enorme Bedeutung der VZV-spezifischen T-Helferzellen bei der Abwehr der endogenen Reaktivierung des Herpes Zoster.

Wie für die CD4+VZV-spezifischen Immunität dargelegt, gleichen sich die messbaren Werte für die CD8+VZV-spezifischen T-Zellen zwischen den Patienten mit einem Herpes Zoster (nach sechs Monaten: $0,04 \pm 0,1$ VZV spezifische CD8+T-Zelle/ 6×10^5 CD4-PBMC) und den Kontroll-Patienten (erste Untersuchung: $0,3 \pm 0,9$ VZV spezifische CD8+T-Zelle/ 6×10^5 CD4-PBMC) im Verlauf weiter an.

Tyring et al. benutzen einen IFN- γ ELISPOT um die zellvermittelte Immunität in einer alters- und geschlechtsangepassten Studie im Vergleich zum Zoster-Schmerz zu messen. Ältere Erwachsene hatten hier eine niedrigere VZV-spezifische zelluläre Immunität als jüngere Probanden zu Beginn der Studie, sowie einen Anstieg der VZV-spezifischen Immunität nach Erkrankung eines Herpes Zoster (Tyring et al., 2012). Diesen Effekt kann man als Booster-Effekt bezeichnen, der auch in dieser Studie dargelegten Daten mit einem Anstieg der VZV-spezifischen CD4+ T-Zellen und VZV-spezifischen CD8+ T-Zellen bei den akut

Zoster-Erkrankungen im Vergleich zu den Kontroll-Patienten messbar war.

Ein Abfall der spezifischen zellulären Immunität bei Zoster-Patienten mittels ELISPOT-Assay konnte nicht gemessen werden.

Es wurde im akuten Stadium des Herpes Zoster bei den Zoster Patienten im Vergleich zu den VZV-seropositiven Kontrollpatienten eine 15-fache Erhöhung der VZV-spezifischen CD4+ T-Zellen und eine 5-fache Erhöhung der VZV-spezifischen CD8+ T-Zellen gemessen werden. Nach 4 Wochen zeigten sich eine 7-fache Erhöhung der VZV-spezifischen CD4+ T-Zellen und eine 3,5-fache Erhöhung der VZV-spezifischen CD8+ T-Zellen bei den Zoster-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Boosterung bei den VZV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen konnte somit nachgewiesen werden (Schaed S.G, 2011).

Eine Prädisposition zur Erkrankung an einem Herpes Zoster aufgrund der Daten ist nicht zu sehen.

Reproduzierbarkeit der Daten Aufgrund der eingeschränkten Anzahl der isolierten PBMCs konnte nur bei fünf Zoster-Patienten und bei drei Kontroll-Patienten eine Wiederholung für den ELISPOT-Assay erfolgen. Damit sollte die Reproduzierbarkeit der Daten gezeigt werden. Allerdings ist einschränkend zu bemerken, dass an Hand der geringen Patientenzahlen nur ein "Trend" aufgezeigt werden kann. Daher wurden die Daten auch nicht ausgewertet und in Kapitel 3.7. dargestellt. Bei der Analyse der Zoster-Patienten der Anzahl der SFC zeigt sich bei der Wiederholung des ELISPOT-Assays eine ähnlich große Streuung wie bei der Durchführung des ersten ELISPOT-Assays, jedoch war die Anzahl der gemessenen SFC sowohl bei den VZV-spezifischen CD4+ T-Zellen, als auch bei den VZV-spezifischen CD8+ T-Zellen deutlich höher (Siehe Tabelle 4.3). Daraus ist zu schließen, dass der hier etablierte ELISPOT-Assay prinzipiell als Nachweismethode der VZV-spezifischen T-Zellen geeignet ist. Es bedarf jedoch noch deutliche Optimierung in der praktischen Durchführung. Weiter muss eine deutlich höhere Patientenzahl rekrutiert werden, um eine gute statistische Aussage zu erreichen.

	ELISPOT	Wiederholung ELISPOT
akut VZV-Antigen	0,57±1,16	4,87 ±8,17
akut Lektin	4,15 ±4,82	6,04 ±10,23

Tabelle 4.3: Mittelwerte der VZV-spezifischen SFC/6x10⁵CD8+ T-Zellen und STABW für die fünf Zoster-Patienten zum akuten Zosterbeginn.

4.8 Ausblick

Die Auswirkungen einer Erkrankung an einem Herpes Zoster wurden ausführlich beleuchtet. Perspektivisch ergibt sich die Frage, welche Rolle der Herpes Zoster in Zukunft im Zusammenhang mit der Entwicklung der Zoster-Vakzine haben wird. Weiter stellt sich die Frage, welchen Einfluss der demographische

Wandel unserer Gesellschaft auf die Inzidenz haben wird.

In einer Studie der Pharmafirma Merck wurde, wie in den bereits zitierten Publikationen, die Sicherheit der Impfung in Bezug auf Windpocken bestätigt. Allerdings wird in dieser Publikation auch der Herpes Zoster einbezogen. Es konnten von 697 berichteten Herpes Zoster Erkrankungen nach der Impfung in 57 Fällen der Oka Varicella-Zoster Virus (= Impfvirus) mittels PCR nachgewiesen werden. Hingegen nur 38-mal der VZV Wildtyp (Galea et al., 2008). Es drängt sich daher die Frage auf, wie sich die VZV- Impfung auf die Erkrankung Herpes Zoster auswirkt.

Um dieser Frage nachzugehen, konnte Takashi et al. zeigen, dass die Inzidenz von Herpes Zoster bei geimpften Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) signifikant geringer ist, als bei Kindern ohne Impfung (Takahashi et al., 2008). Hambleton et al. beobachtete über einen Zeitraum von 10-26 Jahren gesunde Erwachsene nach der VZV-Impfung auf Herpes Zoster. Dabei zeigten von den 363 beobachteten Patienten nur 2 Patienten einen Herpes Zoster (Hambleton et al., 2008). Zusammenfassend kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass die VZV-Impfung ausreichend gegen Herpes Zoster schützt (Jumaan et al., 2005). In einer Auswertung des Robert-Koch-Institutes im August 2013 zeigte sich ein Anstieg der Zoster-Erkrankungen. Als Ursache hierfür könnten ein demographischer Wandel in der Altersstruktur der Bevölkerung, eine erhöhte Meldebereitschaft der Ärzteschaft im Rahmen der Untersuchung zur Varicellenimpfung herrühren Siedler et al. (2013). Die Prävention des Herpes Zoster mittels Zoster-Impfung wird eine herausragende Rolle spielen (Quan et al., 2007). Dennoch sind immer noch nicht die Mechanismen der Reaktivierung des Varicella Zoster Virus verstanden (Gross and Doerr, 2006b). Daher sind weitere Untersuchungen notwendig.

Diese Arbeit kann durch Fortführung der Untersuchungen dazu beitragen, weitere Erklärungsansätze zu finden. So wurden neben den dargestellten Untersuchungen auch noch teilweise eine VZV-Gentypisierung (Kapitel 6.3.) durchgeführt und es erfolgten bei 9 Zoster-Patienten und 11 VZV-seropositiven Kontroll-Patienten die Entnahme von Wangenepithel-Abstrichen zur Durchführung einer HLA-Analyse (bisher nicht erfolgt).

Kapitel 5

Zusammenfassung

Zusammenfassend kann anhand der Datenerhebung aus dem Aktenstudium und den Untersuchungsbögen als Prädisposition für die Erkrankung an einem Herpes Zoster ein erhöhtes Alter festgestellt werden. Rückschlüsse aus dem Krankheitsprofil der Patienten können nicht als Ursache für die Reaktivierung für das Varicella-Zoster Virus geschlossen werden.

An Hand des Blutbildes wird eine Linksverschiebung, d.h. eine Zunahme der neutrophilen stabkernigen Granulozyten während der akuten Erkrankung an einem Herpes Zoster nicht als Prädisposition für die Manifestation eines Zosters, sondern als Ursache dessen gedeutet. Eine Immunsuppression in Form einer Erniedrigung der Lymphozytenzahlen in der mikroskopischen Differenzierung als Prädisposition der Erkrankung eines Herpes Zoster ist in dieser Arbeit nicht zu belegen, sondern ebenso als Folge der Erkrankung zu werten.

In der FACS-Analyse wurde eine Suppression der Lymphozyten-Subpopulationen (Gesamt-Lymphozyten, CD3+ T-Lymphozyten, CD19+ B-Lymphozyten, CD8+ T-Suppressorzellen, CD4+ T-Helferzellen, CD3+ HLA DR+ aktivierte T-Zellen und der CD16+ CD56+ NK-Zellen) zum ersten Messzeitpunkt bei akut Zoster-Erkrankten, im Vergleich zu VZV-seropositiven Kontrollpatienten gemessen. Diese Reduktion der immunologischen Zellen war auch nach vier Wochen noch bei den Gesamt-Lymphozyten, CD3+ T-Lymphozyten, CD8+ T-Suppressorzellen, CD4+ T-Helferzellen und CD16+ CD56+ NK-Zellen bei den Zoster-Patienten nachweisbar (Schaed S.G, 2011). Bei den Zoster-Patienten ist in der akuten Krankheitsphase die erniedrigte Lymphozyten-Subpopulation der CD8+ T-Suppressorzellen, als Ausdruck der Immunsuppression zu werten. Die erhöhte Anzahl der CD3+ HLA DR+ aktivierten T-Zellen spiegelt die akute Immunantwort auf das reaktivierte Varicella-Zoster Virus wieder. Aufgrund der Daten kann also bei den Patienten mit einem akuten Herpes Zoster auf eine Immunsuppression geschlossen werden. Eine Prädisposition zur Manifestation eines Herpes Zoster auf Grund einer Immunsuppression kann jedoch durch das Studiendesign nicht unmittelbar abgeleitet werden.

Ein Abfall der spezifischen zellulären Immunität bei Zoster-Patienten mittels ELISPOT-Assay konnte nicht gemessen werden. Es wurde im akuten Stadium des Herpes Zoster bei den Zoster Patienten im Vergleich zu den VZV-seropositiven Kontrollpatienten eine 15-fache Erhöhung der VZV-spezifischen CD4+ T-Zellen und eine 5-fache Erhöhung der VZV-spezifischen CD8+ T-Zellen

gemessen werden. Nach 4 Wochen zeigten sich eine 7-fache Erhöhung der VZV-spezifischen CD4+ T-Zellen und eine 3,5-fache Erhöhung der VZV-spezifischen CD8+ T-Zellen bei den Zoster-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Sched S.G, 2011).

Nach (Arvin, 2005) sinkt die Anzahl der VZV-spezifischen T-Zellen im Laufe des Lebens und es kommt nach Unterschreitung einer Art Zoster-Schwelle zur Manifestation des Herpes Zoster. Es wird postuliert, dass eine Zoster-Impfung einen Booster-Effekt ausübt und somit den Spiegel der VZV-spezifischen T-Zellen anhebt. Der von Arvin et al. beschriebene Booster-Effekt kann auch nach einer Erkrankung an einem Herpes Zoster angenommen werden. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen mittels ELISPOT-Assay in dieser Arbeit weisen eine Boosterung bei den VZV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen bei Erkrankung eines Herpes Zoster nach.

Ebenfalls konnte in den serologischen Untersuchungen für IgG nach Reaktivierung des Herpes Zoster ein Booster-Effekt nachgewiesen werden.

Der hier etablierte ELISPOT-Assay ist eine Nachweismethode, um die VZV-spezifischen T-Zellen bei Zoster-Patienten zu messen. Jedoch erscheint die Methode in Anbetracht der geringen Spotanzahl, mangelnden Spotentwicklung, sowie Schleierbildung noch weiter verbesserungswürdig und als noch nicht genug sensitiv. Daher sind noch weitere Vorstudien notwendig. Es sollte ein erhöhter Antigeneinsatz verfolgt werden. Außerdem stellt der Einsatz eines ELISA-Antigens (z.B. Bulk-Antigene) eventuell ein Lösungsansatz da. Zur Zellverklumpung während der Konservierung kann der Einsatz von Endonukleasen verfolgt werden. Eine erfolgreiche Vorstimulation mit IL-10 erbrachte keine Verbesserung, jedoch ist eine Kombination des ELISPOT-Assay mit anderen Zytokinen (hier nur γ -Interferon-Nachweis) zu erwägen. Insgesamt sollte eine deutlich höhere Patientenzahl eingeschlossen werden. Aussagen zur Sensitivität der Methode können nicht getroffen werden. Bisher fand die Methode keine Anwendung in der klinischen Routine. Außerdem erscheint in zukünftigen Studien eine Unterscheidung in Responder und Non-Responder sinnvoll.

Kapitel 6

Anhang

6.1 Patienteneinwilligung

Patienteneinwilligung

– Immunologische Untersuchung bei Zoster-Patienten und Kontrollpersonen –

Ich,, wurde von unten genannten Arzt vollständig über Wesen, Bedeutung und Tragweite der klinischen Untersuchung mit dem o. g. Titel aufgeklärt. Ich habe die Patienteninformation gelesen und verstanden. Ich hatte die Möglichkeit, Fragen zu stellen, und habe die Antworten verstanden und akzeptiere sie. Mein Arzt hat mich über die mit der Teilnahme an der Studie verbundenen Risiken und den möglichen Nutzen informiert.

Ich hatte ausreichend Zeit, mich zur Teilnahme an dieser Untersuchungsstudie zu entscheiden und weiß, daß die Teilnahme an dieser klinischen Untersuchung freiwillig ist. Ich weiß, daß ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen diese Zustimmung widerrufen kann, ohne daß sich dieser Entschluß nachteilig auf meine spätere Behandlung auswirken wird.

Ich weiß, daß ich gegen Schäden, die durch die notwendige Materialentnahme entstehen könnten, versichert bin.

Datenschutzrechtliche Patienteneinwilligung (§ 40 Abs.1, Satz 2 und Abs. 2, AMG)

Mir ist bekannt, daß meine persönlichen Daten in verschlüsselter (anonymisierter) Form gespeichert werden. Mir wurde versichert, daß dabei die Grundsätze des Datenschutzes beachtet werden, d.h. meine personenbezogenen Daten vertraulich behandelt und nicht an andere als die nachfolgend genannten Personen und Stellen weitergegeben werden.

Mit meinem Einverständnis zur Teilnahme erkläre ich gleichzeitig, daß ich mit der Weitergabe der im Rahmen dieser klinischen Prüfung/dieses biomedizinischen Forschungsprojektes erfolgenden Aufzeichnung meiner Krankheitsdaten zur Überprüfung an den Auftraggeber, an die zuständigen Überwachungsbehörden oder die zuständige Bundesoberbehörde einverstanden bin.

Ich gestatte hiermit, daß offizielle Vertreter des Auftraggebers dieser Prüfung und zuständiger in- und ausländischer Behörden unter Wahrung der ihnen auferlegten Schweigepflicht Einblick in meine personenbezogenen Krankenakten am Ort der klinischen Prüfung nehmen können. Dies geschieht, um zu gewährleisten, dass alle studienbezogenen Daten korrekt und vollständig erfaßt worden sind.

Schließlich erkläre ich auch mein Einverständnis für die wissenschaftliche Veröffentlichung der Forschungsergebnisse unter Beachtung der datenschutzrechtlichen Bestimmungen.

Ich habe die Patienteninformation und eine Kopie dieser Einwilligungserklärung erhalten. Ich erkläre hiermit meine freiwillige Teilnahme an dieser klinischen Studie.

Ort und Datum

Unterschrift des Patienten

Ort und Datum

Stempel/Unterschrift des Prüfarztes

Abbildung 6.1: Hier ist die Patienteneinwilligung abgebildet, die jeder Studienteilnehmer unterzeichnen musste.

6.2 Untersuchungsbögen

Varicella-Zoster-Virus Untersuchungsbogen Zeitpunkt akut

Name _____ Vorname _____ Geb.Datum _____	Untersucher _____ Datum der Untersuchung _____ Datum Blutentnahme _____
---	--

Anamnese:

1) Prodromalerscheinungen (0-nein, 1-ja)

Müdigkeit _____

Abgeschlagenheit _____

leichtes Fieber _____ (Temp.) _____

andere Allg. Beschwerden _____

Parästhesien _____

Schmerzen _____

Angabe: Skala 1-10 _____

Juckreiz _____

2) Erkrankungsduer _____ (in Tagen)

3) Allgemeine Anamnese (0-nein, 1-ja)

Größe _____ (in cm)

Gewicht _____ (in kg)

Nikotin _____

Alkohol _____

Drogen _____

4) Begleiterkrankungen

Tumorerleiden _____

Immunsuppression _____

z.Z./z.N. Infekt. _____

welcher: _____

Stress _____

Diabetes mellitus _____

HIV _____

Sturz _____

Sonstiges _____

7) Komplikationen (0-nein, 1-ja)

Hautorgan: _____

Bakt. Sekundärinfektion _____

Zoster haemorrhagicus _____

Zoster gangraenosus _____

aberrierende Bläschen _____

Nervensystem _____

Arteritis _____

Zoster opticus _____

Meningitis _____

Lumbalpunktion _____

Auge _____

Konjunktivitis _____

Skleritis _____

Uveitis _____

Innere Organe _____

Pneumonie _____

Ösophagitis _____

Arthritis _____

Zoster oculus _____

Harnverhalt _____

Stuhlverhalt _____

Sonstige: _____

gastro. Beschwerden _____

urolog. Beschwerden _____

neurolog. Beschwerden _____

8) Varizellen in Kindheit _____ (0-nein, 1-ja)

9) Bisher schon einmal an Zoster erkrankt? _____ (0-nein, 1-ja)

Wenn ja wann? _____ Angabe Jahr

5) Bisherige Medikamente (i.v./oral; Dosis; Datum)

Aciclovir	- - -	mg	z.B. 1-1-1-1-1 800mg oral seit 8.07.06
Valaciclovir	- - -	mg	
Famciclovir	- - -	mg	
Brivudin	- - -	mg	
Kortikosteroide	- - -	mg	
Analgetika	- - -	mg	

6) sonstige Begleitmedikamente

_____	- - -	mg
_____	- - -	mg
_____	- - -	mg

Untersuchung:

10) Effloreszenz (0-nein, 1-ja)

Bläschen _____

gruppiert stehend _____

konfluierend _____

Erythem _____

krustös _____

pustulös _____

Foto _____

11) Lokalisation

-Zoster segmentalis (Angabe Dermatome)

	rechts links
- Zoster duplex _____ (0-nein, 1-ja)	
- Zoster disseminatus _____	

12) Sonstiges

13) Weitere Diagnostik

Hämokult (1 pos. / 2 neg.) _____ (Befund)

Ro-Thorax _____ (Befund)

Sono-Abdomen _____ (Befund)

Abbildung 6.2: Untersuchungsbogen für die Erhebung Anamnese und die dermatologisch symptombezogene klinische Untersuchung bei Zoster- und Kontrollpatienten zum Zeitpunkt akut/zo.

Varicella-Zoster-Virus Untersuchungsbogen Zeitpunkt nach 4 Wochen

Name _____ Vorname _____ Geb.Datum _____	Untersucher _____ Datum der Untersuchung _____ Datum BE _____
---	--

1) Anamnese (0-nein, 1-ja)

Schmerzen

Angabe: Skala 1-10

Sind weitere Komplikationen aufgetreten?

Wenn ja welche: _____

Polyneuropathien

2) Begleiterkrankungen

Sind zu den oben genannten Begleiterkrankungen noch neue hinzugetreten? (0-nein, 1-ja)

3) Medikamenten

Analgetika	-	-	-	mg
	-	-	-	mg
	-	-	-	mg

sonstige:

-	-	-	-	mg
-	-	-	-	mg
-	-	-	-	mg
-	-	-	-	mg

4) Hautbefund (0-nein, 1-ja)

hypopigmentierte Narben	
depigmentierte Narben	
granulomatöse Reaktionen	
Psoriasis vulgaris (Köbner-Phänomen)	
Foto	

Abbildung 6.3: Untersuchungsbogen für die Erhebung Anamnese und die dermatologisch symptombezogene klinische Untersuchung bei Zoster- und Kontrollpatienten für den Untersuchungszeitpunkt nach vier Wochen.

Varicella-Zoster-Virus Untersuchungsbogen Zeitpunkt nach 6 Monaten

Name _____ Vorname _____ Geb.Datum _____	Untersucher _____ Datum der Untersuchung _____ Datum BE _____
---	--

1) Anamnese (0-nein, 1-ja)

Schmerzen ☐

Angabe: Skala 1-10 ☐

Sind weitere Komplikationen aufgetreten? ☐

Polyneuropathien ☐

Wenn ja welche: _____

2) Begleiterkrankungen

Sind in den letzten 6 Monaten neue Begleiterkrankungen hinzugetreten? ☐ (0-nein, 1-ja)

Wenn ja, welche? _____

3) Hat sich ihre Lebenssituation in den letzten Monaten geändert? ☐ (0-nein, 1-ja)

(Umzug, Tod Angehörige, Arbeitsplatzverlust...)

Wenn ja wie? _____

4) sonstige Beschwerden

gastrologische Beschwerden ☐ (0-nein, 1-ja)

urologische Beschwerden ☐ (0-nein, 1-ja)

neurologische Beschwerden ☐ (0-nein, 1-ja)

5) Medikamente

Analgetika

_____ - - - mg

_____ - - - mg

_____ - - - mg

sonstige:

_____ - - - mg

_____ - - - mg

_____ - - - mg

_____ - - - mg

6) Hautbefund (0-nein, 1-ja)

hypopigmentierte Narben ☐

depigmentierte Narben ☐

granulomatöse Reaktionen ☐

Psoaris vulgaris (Köbner-Phänomen) ☐

Foto ☐

Abbildung 6.4: Untersuchungsbogen für die Erhebung Anamnese und die dermatologisch symptombezogene klinische Untersuchung bei Zoster- und Kontrollpatienten zur Untersuchung nach sechs Monaten.

Pat.Nr.	1	2	3	4	usw.
Name					
Vorname					
Geburtsdatum					
Geschlecht (m,w)					
Lokalisation des Zosters (Dermatom plus Seitenangabe)					
Schmerzskala akut (VAS 1-10)					
Schmerzskala im Verlauf nach Wiedervorstellung (VAS 1-10)					
Diagnosen (anamnestisch in den Arztbriefen vermerkt)					
Serologischer Nachweis von VZV IgG und IgM, Direktnachweis VZV					
Aciclovir Dosierung					
Dauer des Klinikaufenthalt mit Datum					

Tabelle 6.1: Darstellung der erhobenen Daten für das Aktenstudium anhand von Arztbriefen und sonstigen Dokumenten in der Patientenkartei der Zoster-Patienten in der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität Rostock im Zeitraum der Studie (2006-2007). VAS = Visuellen-Analog-Skala.

6.3 Laboruntersuchungen

Prinzip	Methode	Untersuchungs- material	Anmerkung
Nachweis der Virus-DNA	PCR	Liquor, Bläscheninhalt, Gewebe, Blut, Fruchtwasser, BAL	Goldstandard, spezifisch, sensitiv, schnell durchführbar (ca. 5 Stunden)
Virusisolierung	Anzüchtung in Zellkultur, Nachweis mittels monoklonalem Antikörper	Bläscheninhalt, Gewebe, BAL	spezifisch, schwierig, aufwändig, lange (3-5 Tage)
Nachweis des Virusantigen	IFT mit monoklonalem Antikörper	zellreicher Bläscheninhalt, Gewebe	schnell (2-3 Stunden), eingeschränkte Sensitivität und Spezifität, materialabhängig

Nachweis von Viruspartikeln	Elektronenmikroskopie	Bläscheninhalt, Gewebe, BAL	schnell, zuverlässig, keine Unterscheidung zu anderen Herpesviren
Nachweis von Einschlusskörpern	Histologie bzw. Zytologie	Paraffinschnitt oder Zellpräparat	keine Unterscheidung zu anderen Herpesviren
Antikörpernachweis	ELISA	Serum, Liquor	einfach, sensitiv, kommerziell vertrieben und automatisiert, Ergebnis in mIU/ml
	IFT	Serum, Liquor	einfach, Erfahrung für Auswertung, sensitiv, z.T. kommerziell vertrieben, Ergebnis in Titern
	NT	Serum	gute Korrelation mit FAMA, schwierig, keine Routinemethode
	FAMA	Serum	Bestimmung der Immunität, aufwändig, keine Routine
	KBR	Serum	einfach, keine Differenzierung Immunglobulinklassen, wenig sensitiv, z.T. kommerziell vertrieben, Ergebnis in Titern

Tabelle 6.3: Übersicht über die gängigsten Methoden der Labordiagnostik von Infektionen mit dem Varicella-Zoster Virus. Modifiziert nach (Wutzler and Sauerbrei, 2009) .

PCR = Polymerase Chain Reaction, BAL = bronchoalveoläre Lavage, IFT = Immunfluoreszenztest, ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay, NT = Neutralisationtest, FAMA = Fluoreszenz-Antikörper-Membran-Antigen-Test, KBR = Komplementbindungsreaktion.

Probeentnahme	Laboruntersuchung
2 EDTA-Röhrchen (je 2,7 ml)	• <i>Blutbild:</i> Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten, MCV, MCH, MCHC, Leukozyten, Thrombozyten, Leukozyten, Monozyten • <i>Mikroskopische Differenzierung:</i> eosinophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten, neutrophile Stabkernige, neutrophile Segmentkernige, basophile Granulozyten • <i>Immunstatus (FACS Simultest, BD Simultest IMK lymphocyte kit):</i> Absolutzahlen und % Leukozyten: T-Zellen (CD3 +), B-Zellen (CD19+), T-Suppressorzellen (CD8+), T-Helferzellen (CD4+), akt. T-Zellen (CD3+, HLA-DR), NK- Zellen (CD16+, CD56+), NK-Zellen (CD3+, CD16+, CD56+), CD4/CD8-Ratio
1 Serum Röhrchen (je 7,5 ml)	• <i>Serologie:</i> VZV IgG AK, VZV IgM AK, HIV AG/AB-Combo
5-6 Heparin-Röhrchen (je 9 ml)	• <i>PBMC Isolierung:</i> mit dem Ficoll-Gradienten, Kryokonservierung bei -70°C für ELISPOT- Assay
Zusätzlich für Zoster-Patienten: Direktnachweis VZV aus Bläschengrund Direktnachweis HSV aus Bläschengrund	• Varicella-Zoster Virus Direct immunoflorescence Assay, Millipore • HSV1/HSV2 Collection Kit, MicroTrak PathoD_x Herpes Typing Kit, remel

Tabelle 6.4: Übersicht zu bestimmten Laborparametern.

Lösung	Zusammensetzung	Firma	Herstellung
<i>RPMI/FCS</i> 10%	RPMI 1640 + P/S 1% + L-Glut 1% + NEAA 1% + FCS 10%	12-167 F, Cambrex, Belgium Pen-Streptomycin-Mix 17-602 E, Cambrex, Belgium 17-605 E, Cambrex, Belgium 13-114E, Cambrex, Belgium Fetales Kälber Serum, “Gold” PAA, ZAP	Auf 500 ml, steril filtriert, Lagerung bei 2-8° C
<i>RPMI/HS 10%</i>	RPMI 1640 + P/S 1% + L-Glut 1% + NEAA 1% + HS 10%	12-167 F, Cambrex, Belgium Pen-Streptomycin-Mix 17-602 E, Cambrex, Belgium 17-605 E, Cambrex, Belgium 13-114E, Cambrex, Belgium Human Serum, H 4522, Sigma-Aldrich, Germany	Auf 250 ml, steril filtriert, Lagerung bei 2-8° C
<i>MACS-Puffer</i> = <i>PBS pH 7,2</i> / <i>0,5% BSA</i> / <i>2mM EDTA</i>	500ml DPBS + 2,5g BSA + 2 ml EDTA 0,5 M	17-512 F, DPBS ohne Ca & Mg, Cambrex, Belgium A 1470, Sigma-Aldrich, Germany E 7889, Sigma-Aldrich, Germany	Unsteril in 50 ml Aliquots eingefroren; vor der Verwendung aufgetaut, dann steril filtriert
<i>0,1 N acetic acid</i>	Acetic acid 2,0 N mit Aqua dest auf 1:20 verdünnt	A 8976, Sigma-Aldrich, Germany	Unsteril auf 200 ml, Lagerung bei 20°C
<i>1 N sodium acetat</i>	Sodium acetat 3M mit Aqua dest auf 1:3 verdünnt	71196, Sigma-Aldrich, Germany	Unsteril auf 100 ml, Lagerung bei 20°C
<i>VZV-Antigen</i>	Antigen +1 ml DPBS	Serion KBR 1191, SFS.32, Virion/Serion D, Würzburg, Germany 17-512 F, DPBS ohne Ca & Mg, 17-512 F, Cambrex, Belgium	Steril in 100 µl Aliquots, bei -70°C eingefroren
<i>VZV-Kontroll-Antigen</i>	Antigen + 1 ml DPBS	Serion KBR 2191, SFS.32, Virion/Serion D, Würzburg, Germany 17-512 F DPBS ohne Ca & Mg, Cambrex, Belgium	Steril in 100 µl Aliquots, bei -70°C eingefroren
<i>Ko-Stimulanz</i>	16 µl DPBS + 2 µl CD28 + 2 µl CD49d	17-512 F, DPBS ohne Ca & Mg, Cambrex, Belgium 340975, BD Biosciences 340976, BD Biosciences	Steril in 100 µl Aliquots, Lagerung bei 4°C
<i>PBS (1x) / Tween 0,05%</i>	PBS + Tween	14200-067, PBS mit CaCl ₂ , MgCl ₂ , Gibco, Germany P7949-500ML, Sigma-Aldrich, Germany	Unsteril auf 2 l, Lagerung bei 2-8°C

<i>PBS (1x) / Tween 0,1%</i>	PBS +Tween	14200-067, PBS mit CaCl ₂ , MgCl ₂ , Gibco, Germany P7949-500ML, Sigma-Aldrich, Germany	Unsteril auf 200 ml, Lagerung bei 2-8°C
<i>PBS / BSA 0,5 %</i>	PBS +BSA	14200-067, PBS mit CaCl ₂ , MgCl ₂ , Gibco, Germany A 1470, Albumin bovine serum, Sigma-Aldrich, Germany	Unsteril auf 250 ml, Lagerung bei 2-8°C

Tabelle 6.6: Übersicht der beim ELISPOT-Assay verwendeten selbst hergestellten Substrate mit Zusammensetzung und Herstellernachweis.

6.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

6.4.1 Zusammenfassung Aktenstudium

Zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung	Mittelwert	Absolut	STABW
Multimorbide (> 3 internistische Erkrankungen)		15,3 %	0,36
Alter in Jahren zum Zeitpunkt der akuten Erkrankung	64,65		17,6
Lokalisation Zoster Trigeminus 1		39,5 %	0,50
Trigeminus 2		4%	0,21
Trigeminus 3		1,6%	0,14
Cervikal		10,5%	0,33
Thorakal		26,6%	0,46
Lumbal		12,1%	0,35
Sakral		5,6%	0,25
Seitenlokalisierung: rechts		52,3%	0,50
Seitenlokalisierung: links		47,7%	0,49
Anzahl der betroffenen Dermatome	1,17		
1 Dermatom		88	0,38
2 Dermatome		16	0,36
4 Dermatome		1	0,10
Zoster sine herpete		1	0,10
Generalisation des Zosters		14	0,34
Schmerzen akute Erkrankung (VAS = 0-10)	4,4		3,34
Schmerzen Verlaufsuntersuchung (VAS = 0-10)	1,4		2,43

Zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung	Mittelwert	Absolut	STABW
Multimorbide (> 3 internistische Erkrankungen)		15,3 %	0,36
Arterielle Hypertonie		48,6 %	0,50
Herpes Zoster in der Vergangenheit		1,9 %	0,14
Diabetes mellitus		17,3 %	0,38
Atemwegserkrankungen		9,6 %	0,3
neoplastische Erkrankung in der Vergangenheit		12,5 %	0,33
Herz-Kreislauf Erkrankung		25 %	0,43
akute oder chron. Entzündung		14,4 %	0,35
Immunsuppression		1,9 %	0,36
Direktnachweis VZV positiv		79,1 %	0,40
VZV IgG im Serum (mIU/ml)	2034,9		1679,6
VZV IgM im Serum positiv		44,6 %	0,59
Medikation mit Aciclovir (in mg/kg KG 3 x täglich)	8,5	1,19	1,19

Tabelle 6.8: Zoster-Patienten der Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität Rostock während des Zeitraumes der Studiendurchführung, die nach Aktenlage im Aktenstudium untersucht wurden.

6.4.2 Zusammenfassung Untersuchungsbögen

Merkmal quantitativ in %	Z a	Z v1	Z v2	K x0	K v1	K v2
neoplastische Erkrankung in der Vergangenheit	18,2			5,6		
Herz-Kreislauf-Erkrankung (außer arterieller Hypertonie)	36,4			38,9		
Parästhesien	11,0	13,6				
Schmerzen (Angabe in VAS)						
VAS = 1						
VAS = 2	9,1	4,5				
VAS = 3	4,5					
VAS = 4	9,1	9,1	4,5			
VAS = 5	4,5	9,1				
VAS = 6	9,1	9,1				
VAS = 7	22,7					
VAS = 8	9,1	4,5				
VAS = 9	4,5					
VAS = 10		4,5				

Merkmal quantitativ in %	Z a	Z v1	Z v2	K x0	K v1	K v2
neoplastische Erkrankung in der Vergangenheit	18,2			5,6		
Herz-Kreislauf-Erkrankung (außer arterieller Hypertonie)	36,4			38,9		
Juckreiz	13,0	9,1	9,1			
Stresssituation	36,4			16,7		
arterielle Hypertonie	50,0			38,9		
Diabetes mellitus	9,1			16,7		
Atemwegserkrankung	4,5			11,1		
Multimorbide (> 3 internistische Erkrankungen)	4,5			16,7		
analgetische Therapie mit Paracetamol 500 mg	95,5			11,1		
analgetische Therapie mit Amitriptylin 25 mg	77,3					
Bakterielle Sekundärinfektion des Herpes Zoster	4,5					
aberrierende Bläschen	31,8					
Zoster opticus	13,6					
Kopfschmerzen	45,5					
Pneumonie	4,5					
gastroenterologische Beschwerden	9,1			11,1		
urologische Beschwerden	4,5			5,6		
neurologische Beschwerden	9,1					
Herpes Zoster in Vergangenheit	9,1			11,1		
Dermatom Trigeminus 1	36,4					
Dermatom Trigeminus 2	4,5					
Dermatom Cervikal	27,3					
Dermatom Thorakal	40,9					
Dermatom Lumbal	13,6					
Dermatom Sakral	9,1					
Betroffene Dermatomanzahl:	.					
1 Dermatom	59,1					
2 Dermatome	13,6					
3 Dermatome	18,2					
4 Dermatome	9,1					
neue Begleiterkrankungen im Verlauf		9,1	9,1		11,1	5,6

Merkmal qualitativ	Z a	K x0
Alter in Jahren zum Zeitpunkt der akuten Zoster-Erkrankung	67,7	68,3
Körpergröße in cm	169,6	168,9
Körpergewicht in kg	72,2	74,0
Body-Mas-Index	25,1	26,0

Tabelle 6.11: **Auswertung Untersuchungsbögen Zoster-Patient und VZV-seropositiver Träger Merkmal (qualitativ).** Angabe als arithmetischer Mittelwert. Z = Zoster, K = Kontrolle; a = Zeitpunkt akut bzw. x0 Zeitpunkt 1. Untersuchung, v1 = Zeitpunkt nach 4 Wochen, v2 = Zeitpunkt nach 6 Monaten.

Tabelle 6.10: **Auswertung Untersuchungsbögen Zoster-Patient und VZV-seropositiver Träger Merkmal (quantitativ).** Z = Zoster, K = Kontrolle; a = Zeitpunkt akut bzw. x0 Zeitpunkt 1. Untersuchung, v1 = Zeitpunkt nach 4 Wochen, v2 = Zeitpunkt nach 6 Monaten; VAS= Visuelle Annahme Skala.

6.4.3 Zusammenfassung Blutbilder

	Zoster-Patient	VZV-sero positiver Träger	***	**	*	
Hämoglobin akut/x0	8,3 ±1,0	8,4 ± 0,8				p=0.913
nach 4 Wochen	8,3 ± 1,0	8,6 ± 0,9				p=0.239
nach 6 Monaten	8,2 ± 0,7	8,6 ± 0,3				p=0.431
Hämatokrit akut/x0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0				p=0.935
nach 4 Wochen	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0				p=0.296
nach 6 Monaten	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0				p=0.896
Erythrozyten akut/x0	4,4 ± 0,6	4,4 ± 0,4				p=0.899
nach 4 Wochen	4,4 ± 0,7	4,5 ± 0,4				p=0.325
nach 6 Monaten	4,3 ± 0,4	4,4 ± 0,4				p=0.697
MCV akut/x0	90,5 ± 6,4	90,2 ± 5,7				p=0.596
nach 4 Wochen	91,9 ± 6,1	90,9 ± 5,5				p=0.472
nach 6 Monaten	90,8 ± 2,7	93,4 ± 8,9				p=0.606

	Zoster-Patient	VZV-sero positiver Träger	***	**	*	
MCH akut/x0	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,1				p=0.531
nach 4 Wochen	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,1				p=0.659
nach 6 Monaten	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,2				p=1.000
MCHC akut/x0	21,0 ± 0,8	21,0 ± 0,6				p=0.935
nach 4 Wochen	20,8 ± 0,7	21,0 ± 0,8				p=0.185
nach 6 Monaten	21,1 ± 0,4	21,3 ± 0,7				p=0.364
Leukozyten akut/x0	6,7 ± 1,9	7,8 ± 2,2				p=0.157
nach 4 Wochen	7,2 ± 2,2	8,0 ± 2,9				p=0.371
nach 6 Monaten	5,8 ± 1,0	5,9 ± 1,2				p=0.796
Thrombozyten akut/x0	207,1 ± 79,1	263,6 ± 105,8				p=0.057
nach 4 Wochen	282,5 ± 124,5	236,2 ± 62,6				p=0.363
nach 6 Monaten	237,0 ± 79,2	242,33 ± 47,3				p=1.000
Eosinophile Granulozyten akut/x0	2,0 ± 1,9	3,3 ± 3,4				p=0.362
nach 4 Wochen	2,8 ± 1,9	1,5 ± 1,6			p=0.030	
nach 6 Monaten	4,5 ± 3,6	0,3 ± 0,6			p=0.027	
Neutrophile Stabkernige akut/x0	10,3 ± 11,6	2,4 ± 3,3	p=0.001			
nach 4 Wochen	5,5 ± 5,5	5,6 ± 4,8				p=0.918
nach 6 Monate	3,2 ± 1,5	4,7 ± 3,5				p=0.433
Neutrophile Segmentkernige akut/x0	57,9 ± 15,4	59,3 ± 13,1				p=0.849
nach 4 Wochen	59,8 ± 14,5	61,8 ± 8,7				p=0.918
nach 6 Monaten	55,8 ± 9,3	54,7 ± 8,0				p=0.796

	Zoster-Patient	VZV-sero positiver Träger	***	**	*	
Lymphozyten akut/x0	21,9 ± 15,2	26,3 ± 11,9				p=0.150
nach 4 Wochen	22,3 ± 12,1	22,4 ± 9,5				p=0.918
nach 6 Monaten	28,0 ± 13,4	26,3 ± 11,2				p=0.897
Monozyten akut/x0	9,8 ± 3,9	7,4 ± 4,2				p=0.076
nach 4 Wochen	8,1 ± 4,3	7,9 ± 3,2				p=0.976
nach 6 Monaten	7,0 ± 3,6	12,7 ± 5,0				p=0.120
Basophile Granulozyten akut/x0	1,8 ± 2,6	10,0 ± 0,9				p=0.130
nach 4 Wochen	0,7 ± 0,6	0,4 ± 0,6				p=0.153
nach 6 Monaten	1,0 ± 0,9	0,7 ± 0,6				p=0.581

Tabelle 6.13: Vergleich Zoster-Patient und VZV-seropositiver Träger. Mittelwert und Standardabweichung (STABW), sowie Angabe der Signifikanz.

6.4.4 Blutbild Vergleich innerhalb der Probandengruppen nach Geschlecht

Laborparamter und Zeitpunkt	Zoster-Patient	VZV-seropositiver Träger
Hämoglobin (akut bzw. x0)	(m: 8,64; w: 7,88)	$p=0.018$ (m: 8,84; w: 7,89)
Hämoglobin (nach vier Wochen)	(m: 8,45; w: 8,00)	$p=0.019$ (m:9,04; w: 8,07)
Hämatokrit (akut bzw. x0)	(m: 0,41; w: 0,38)	$p=0.014$ (m: 0,42; w: 0,0,38)
Hämatokrit (nach vier Wochen)	(m: 0,40; w: 0,39)	$p=0.021$ (m: 0,43; w: 0,0,39)
MCHC (akut bzw. x0)	$p=0.013$ (m: 21,28 ; w: 20,67)	(m: 21,22; w: 20,75)
MCHC (nach vier Wochen)	$p=0.042$ (m: 20,88; w: 20,61)	$p=0.028$ (m: 21,31; w: 20,53)
Thrombozyten (akut bzw. x0)	(m: 188,61; w: 233,67)	$p=0.041$ (m: 239,40; w: 293,88)

Laborparamter und Zeitpunkt	Zoster-Patient	VZV-seropositiver Träger
Basophile Granulozyten (nach vier Wochen)	$p=0.047$ (m: 0,40 ; w: 2,25)	(m: 0,60; w: 0,57)

Tabelle 6.15: **Geschlechtsspezifische Unterschiede** innerhalb der Probandengruppe zu den drei untersuchten Zeitpunkten. Weiterhin Angabe der Mittelwerte in SI-Einheiten, wobei m= männlich und w= weiblich.

6.4.5 Zusammenfassung Immunstatus

	Zoster- Patient	VZV-seropositiver Träger	***	**	*
Gesamt- Lymphozyten Anzahl absolut akut/x0	1361,4 ± 891,6	2516,7 ± 1583,1		p=0.003	
Anzahl absolut nach 4 Wochen	1578,6 ± 641,4	2132,4 ± 929,8		p=0.047	
Anzahl absolut nach 6 Monaten	1730,0 ± 780,0	1573,3 ± 851,5			p=0.796
Gesamt- Lymphozyten Anzahl prozentual akut/x0	23,2 ± 19,5	31,2 ± 12,2		p=0.015	
Anzahl prozentual nach 4 Wochen	25,9 ± 11,4	27,7 ± 9,6			p=0.566
Anzahl prozentual nach 6 Monaten	31,0 ± 8,8	26,3 ± 11,2			p=0.795
T-Lymphozyten Anzahl absolut akut/x0	989,1 ± 711,8	1845,0 ± 1391,5		p=0.004	
Anzahl absolut nach 4 Wochen	1199,1 ± 489,1	1534,7 ± 839,1			p=0.223
Anzahl absolut nach 6 Monaten	1381,7 ± 682,7	1136,7 ± 653,1			p=0.302
T-Lymphozyten Anzahl prozentual akut/x0	76,9 ± 7,9	71,4 ± 9,5			p=0.062
Anzahl prozentual nach 4 Wochen	74,2 ± 16,0	68,8 ± 10,0		p=0.023	
Anzahl prozentual nach 6 Monaten	78,7 ± 2,9	72,7 ± 12,7			p=0.437

	Zoster-Patient	VZV-positiver Träger	***	**	*
B-Lymphozyten Anzahl absolut akut/x0	98,4± 84,7	201,1±163,6		p=0.006	
Anzahl absolut nach 4 Wochen	112,8± 68,8	173,5± 112,5			p=0.108
Anzahl absolut nach 6 Monaten	140,0± 66,3	140,0± 149,3			p=0.439
B-Lymphozyten Anzahl prozentual akut/x0	8,3± 4,9	7,9± 3,6			p=0.806
Anzahl prozentual nach 4 Wochen	7,1± 3,6	8,0± 3,3			p=0.385
Anzahl prozentual nach 6 Monaten	8,3± 2,7	7,0± 4,6			p=0.439
T-Suppressorzellen Anzahl absolut akut/x0	371,9± 359,7	555,0± 492,3		p=0.047	
Anzahl absolut nach 4 Wochen	467,1± 272,3	430,6± 254,7			p=0.547
Anzahl absolut nach 6 Monaten	455,0± 247,4	270,0± 173,5			p=0.243
T-Suppressorzellen Anzahl prozentual akut/x0	28,3 ± 13,4	21,3 ± 6,3			p=0.134
Anzahl prozentual nach 4 Wochen	31,4 ± 15,1	19,9 ± 5,9		p=0.013	
Anzahl prozentual nach 6 Monaten	26,8 ± 9,6	18,0 ± 9,0			p=0.197

	Zoster-Patient	VZV-positiver Träger	***	**	*
T-Helferzellen Anzahl absolut akut/x0	604,8 ± 467,7	1313,3 ± 945,4		p=0.001	
Anzahl absolut nach 4 Wochen	711,9 ± 394,2	1104,7 ± 663,8		p=0.034	
Anzahl absolut nach 6 Monaten	981,7 ± 592,6	870,0 ± 482,2			p=0.697
T-Helferzellen Anzahl prozentual akut/x0	48,3 ± 13,7	51,0 ± 9,6			p=0.744
Anzahl prozentual nach 4 Wochen	43,7 ± 13,6	49,4 ± 10,0			p=0.251
Anzahl prozentual nach 6 Monaten	54,5 ± 7,2	55,3 ± 5,0			p=0.795
aktivierte T-Zellen Anzahl absolut akut/x0	144,3 ± 100,7	257,2 ± 227,6		p=0.034	
Anzahl absolut nach 4 Wochen	197,1 ± 193,6	217,1 ± 193,1			p=0.480
Anzahl absolut nach 6 Monaten	90,0 ± 42,0	133,3 ± 25,2			p=0.118
aktivierte T-Zellen Anzahl prozentual akut/x0	13,2 ± 6,0	9,8 ± 4,1			p=0.076
Anzahl prozentual nach 4 Wochen	11,6 ± 6,9	12,5 ± 11,8			p=0.670
Anzahl prozentual nach 6 Monaten	5,3 ± 2,9	9,3 ± 4,2			p=0.120

	Zoster-Patient	VZV-positiver Träger	***	**	*
NK-Zellen (CD16+, CD56+) Anzahl absolut akut/x0	119,5 ± 101,2	462,2 ± 503,0	p=0.001		
Anzahl absolut nach 4 Wochen	219,5 ± 228,0	394,1 ± 152,3	p=0.001		
Anzahl absolut nach 6 Monaten	175,0 ± 44,6	290,0 ± 175,2			p=0.364
NK-Zellen (CD16+, CD56+) % Anzahl prozentual akut/x0	11,5 ± 8,1	17,4 ± 10,5		p=0.043	
Anzahl prozentual nach 4 Wochen	13,3 ± 9,3	21,0 ± 11,2		p=0.017	
Anzahl prozentual nach 6 Monaten	11,0 ± 3,4	19,7 ± 12,4			p=0.195
NK-Zellen (CD3+, CD16+, CD56+) Anzahl absolut akut/x0	77,6 ± 101,2	97,8 ± 60,1			p=0.070
Anzahl absolut nach 4 Wochen	70,0 ± 62,2	115,9 ± 82,8			p=0.059
Anzahl absolut nach 6 Monaten	111,7 ± 87,0	73,3 ± 45,1			p=0.559
NK-Zellen (CD3+, CD16+, CD56+) Anzahl prozentual akut/x0	7,3 ± 7,3	4,3 ± 2,9			p=0.147
Anzahl prozentual nach 4 Wochen	5,3 ± 5,1	6,5 ± 5,1			p=0.298
Anzahl prozentual nach 6 Monaten	6,2 ± 3,7	5,0 ± 3,0			p=0.692

	Zoster- Patient	VZV-seropositiver Träger	***	**	*	
CD4/CD8-Ratio						
akut /x0	2,5 ± 2,3	2,7 ± 1,4				p=0.253
nach 4 Wochen	1,9 ± 1,6	2,7 ± 1,2			p=0.012	
nach 6 Monaten	2,4 ± 1,3	3,6 ± 1,7				p=0.121

Tabelle 6.16: **Vergleich Zoster-Patient und VZV-seropositiver Träger.**
Mittelwert, Standardabweichung (STABW) und Signifikanzniveau.

6.4.6 Zusammenfassung Serologie

		Zoster-Patient	VZV-seropositiver Träger	Signifikanz
akut/x0 HSV1 IgG (mIU/ml)	<i>Mittelwert</i>	1100,17		
	<i>STABW</i>	679,91		
akut/x0 HSV1 IgG (1=positiv, 2=negativ)	<i>Mittelwert</i>	2,00		
	<i>STABW</i>	0,00		
nach 4 Wochen HSV1 IgG (mIU/ml)	<i>Mittelwert</i>	239,00		
	<i>STABW</i>	0,00		
akut/x0 HSV2 IgG (mIU/ml)	<i>Mittelwert</i>	213,98		
	<i>STABW</i>	111,62		
akut/x0 HSV2 IgG (1=positiv, 2=negativ)	<i>Mittelwert</i>	2,00		
	<i>STABW</i>	0,00		
nach 4 Wochen HSV2 IgG (mIU/ml)	<i>Mittelwert</i>	31,00		
	<i>STABW</i>	0,00		
akut/x0 HSV1 und HSV2 IgM (1=positiv, 2=negativ, 3=grenzwertig)	<i>Mittelwert</i>	2,00		
	<i>STABW</i>	0,00		
nach vier Wochen HSV1 und HSV2 IgM (1=positiv, 2=negativ, 3=grenzwertig)	<i>Mittelwert</i>	2,00		
	<i>STABW</i>	0,00		
akut/x0 VZV IgG (mIU/ml)	<i>Mittelwert</i>	1432,60	3000,00	
	<i>STABW</i>	994,26	0,00	
nach 4 Wochen VZV IgG (mIU/ml)	<i>Mittelwert</i>	3323,29	1166,00	p=0.001
	<i>STABW</i>	2907,27	906,73	

		Zoster-Patient	VZV-seropositiver Träger	<i>Signifikanz</i>
akut/x0 VZV IgM (1=positiv, 2=negativ, 3=grenzwertig)	<i>Mittelwert</i>	1,95	2,00	p=0.823
	<i>STABW</i>	0,22	0,00	
nach 4 Wochen VZV IgM (1=positiv, 2=negativ, 3=grenzwertig)	<i>Mittelwert</i>	1,62	2,00	p=0.022
	<i>STABW</i>	0,74	0,00	
akut/x0 HIV (1=positiv, 2=negativ, 3=grenzwertig)	<i>Mittelwert</i>	2,00	2,00	p=1.000
	<i>STABW</i>	0,00	0,00	
nach 4 Wochen HIV (1=positiv, 2=negativ, 3=grenzwertig)	<i>Mittelwert</i>	2,00	2,00	p=1.000
	<i>STABW</i>	0,00	0,00	
akut/x0 Direkte Immunfluoreszenz HSV1 (1=positiv, 2=negativ, 3=grenzwertig)	<i>Mittelwert</i>	2,00		
	<i>STABW</i>	0,00		
akut/x0 Direkte Immunfluoreszenz HSV2 (1=positiv, 2=negativ, 3=grenzwertig)	<i>Mittelwert</i>	2,00		
	<i>STABW</i>	0,00		
akut/x0 Direkte Immunfluoreszenz VZV (1=positiv, 2=negativ, 3=grenzwertig)	<i>Mittelwert</i>	1,00		
	<i>STABW</i>	0,00		
nach 6 Monaten VZV IgG (mIU/ml)	<i>Mittelwert</i>	2563,40		
	<i>STABW</i>	976,27		

		Zoster-Patient	VZV-seropositiver Träger	Signifikanz
nach 6 Monaten VZV IgM (1=positiv, 2=negativ, 3=grenzwertig)	<i>Mittelwert</i>	2,00		
	<i>STABW</i>	0,00		

Tabelle 6.18: Vergleich Zoster-Patient und VZV-seropositiver Träger. Mittelwert und Standardabweichung (STABW), sowie Signifikanzniveau.

6.4.7 Zusammenfassung ELISPOT-Assay

		Zoster-Patient	VZV-seropositiver Träger	Signifikanz
akut/x0 Medium	<i>Mittelwert</i>	0,00	0,00	p=1,00
	<i>STABW</i>	0,00	0,00	
nach 4 Wochen Medium	<i>Mittelwert</i>	0,00	0,00	p=1,00
	<i>STABW</i>	0,00	0,00	
nach 6 Monaten Medium	<i>Mittelwert</i>	0,00		
	<i>STABW</i>	0,00		
akut/x0 VZV-Antigen	<i>Mittelwert</i>	2,98	0,21	p=0,001
	<i>STABW</i>	5,26	0,88	
nach 4 Wochen VZV-Antigen	<i>Mittelwert</i>	0,73	0,06	p=0,026
	<i>STABW</i>	2,36	0,31	
nach 6 Monaten VZV-Antigen	<i>Mittelwert</i>	0,05		
	<i>STABW</i>	0,22		
akut/x0 Kontroll-Antigen	<i>Mittelwert</i>	0,47	0,06	p=0,176
	<i>STABW</i>	1,61	0,27	
nach 4 Wochen Kontroll-Antigen	<i>Mittelwert</i>	0,70	0,22	p=0,027
	<i>STABW</i>	1,44	0,59	
nach 6 Monaten Kontroll-Antigen	<i>Mittelwert</i>	0,21		
	<i>STABW</i>	0,60		
akut/x0 Lectin	<i>Mittelwert</i>	14,58	14,92	p=0,240
	<i>STABW</i>	31,16	25,53	

		Zoster-Patient	VZV-seropositiver Träger	<i>Signifikanz</i>
nach 4 Wochen Lectin	<i>Mittelwert</i>	21,97	4,28	p=0,009
	<i>STABW</i>	43,87	7,18	
nach 6 Monaten Lectin	<i>Mittelwert</i>	8,91		
	<i>STABW</i>	7,10		

Tabelle 6.20: **VZV-spezifische CD4+T-Zellen im Vergleich zwischen Zoster-Patient und VZV-seropositiver Träger.** Mittelwert, Standardabweichung (STABW) und Signifikanzniveau.

		Zoster-Patient	VZV-seropositiver Träger	<i>Signifikanz</i>
akut/x0 Medium	<i>Mittelwert</i>	0,00	0,00	p=1,00
	<i>STABW</i>	0,00	0,00	
nach 4 Wochen Medium	<i>Mittelwert</i>	0,00	0,00	p=1,00
	<i>STABW</i>	0,00	0,00	
nach 6 Monaten Medium	<i>Mittelwert</i>	0,00		
	<i>STABW</i>	0,00		
akut/x0 VZV- Antigen	<i>Mittelwert</i>	1,46	0,26	p=0,003
	<i>STABW</i>	2,89	0,87	
nach 4 Wochen VZV- Antigen	<i>Mittelwert</i>	0,37	0,42	p=0,539
	<i>STABW</i>	1,10	1,42	
nach 6 Monaten VZV- Antigen	<i>Mittelwert</i>	0,04		
	<i>STABW</i>	0,15		
akut/x0 Kontroll-Antigen	<i>Mittelwert</i>	0,44	0,19	p=0,039
	<i>STABW</i>	0,86	0,75	
nach 4 Wochen Kontroll-Antigen	<i>Mittelwert</i>	0,91	0,08	p=0,032
	<i>STABW</i>	3,06	0,34	
nach 6 Monaten Kontroll-Antigen	<i>Mittelwert</i>	0,00		
	<i>STABW</i>	0,00		
akut/x0 Lectin	<i>Mittelwert</i>	5,05	3,57	p=0,150
	<i>STABW</i>	8,92	6,64	
nach 4 Wochen Lectin	<i>Mittelwert</i>	12,41	3,54	p=0,001

		Zoster-Patient	VZV-seropositiver Träger	Signifikanz
	<i>STABW</i>	21,61	7,75	
nach 6 Monaten Lectin	<i>Mittelwert</i>	4,94		
	<i>STABW</i>	6,60		

Tabelle 6.22: **VZV-spezifische CD8+ T-Zellen im Vergleich zwischen Zoster-Patient und VZV-seropositiver Träger.** Mittelwert, Standardabweichung (STABW) und Signifikanzniveau.

6.5 Varicella-Zoster Virus Gentypisierung

Bei 7 der 22 untersuchten Zoster-Patienten fand in Kooperation mit der Johann-Wolfgang Universität, Frankfurt am Main eine Genotypisierung statt. In der Tab.6.23. werden nur die Ergebnisse der in diese Arbeit eingeschlossenen Patienten dargestellt. Die Gesamtergebnisse wurden letztmalig von Schmidt-Chanasit et al. im Jahre 2008 veröffentlicht (Schmidt-Chanasit et al., 2007, 2008).

Es konnten bei allen D-Genotypen die C119T und C1606A Mutation festgestellt werden, die zu einem Aminosäuren Austausch führt (T40I und L536I). Zwei völlig unbekannte Mutationen zeigten die Patienten 20 und 21, wobei bei der letzten Patientin die gleiche Mutation auch bei einer anderen Zoster-Patienten aus Rostock, welche nicht in diese Arbeit eingeschlossen war, vorlag. Diese Mutationen lagen außerhalb der kodierenden Regionen von e1 und c1 (Schmidt-Chanasit et al., 2008).

Patienten-Nummer	VZV-strain	Genotyp	Glykoprotein E Mutation
14	Ger94	D	C119T, T660C, C1606A
15	Ger97	A	keine
16	Ger101	D	C119T, T660C, C1606A
17	Ger104	D	C119T, T660C, C1606A
19	Ger106		neg. Taq Man
20	Ger107	A	G1284A
21	Ger115	D	C119T, T660C, C1606A, T1683G

Tabelle 6.23: **VZV-Genotypisierung bei Zoster-Patienten.** Übersicht über die Wildtypen (Ger = German), Genotypen und die Glykoprotein E Mutation. Neumutationen werden besonders gekennzeichnet. Nach Schmidt-Chanasit et al. (Schmidt-Chanasit et al., 2008).

6.6 Übersicht laborspezifische Referenzwerte

Parameter	Absolutzahl/ μl	% Leukozyten
Gesamt-Lymphozyten	1600-2400	28-29
T-Zellen (CD3+)	1100-1700	67-76
B-Zellen (CD19+)	200-400	11-16
T-Suppressorzellen (CD8+)	500-900	31-40
T-Helferzellen (CD4+)	700-1100	38-46
akt. T-Zellen (CD3+, HLA-DR)		8-15
NK-Zellen (CD16+, CD56+)	200-400	10-19
NK-Zellen (CD3+, CD16+, CD56+)		
CD4/CD8-Ratio	1,0-1,5	

Tabelle 6.24: **Referenzwerte für den Immunstatus** nach dem Institut für Immunologie der Universität Rostock

Parameter	Normbereich	SI-Einheit
Hämoglobin	8,6-12	mmol/l
Hämatokrit	0,4-0,51	%
Erythrozyten	4,5-5,5	$10^{12}/\text{l}$
MCV	83-93	fl
MCH	1,55-1,9	fmol
MCHC	18,5-22,5	mmol/l
Leukozyten	4,9	$10^9/\text{l}$
Thrombozyten	150-450	$10^9/\text{l}$
Eosinophile Granulozyten	<5	%
Neutrophile Stabkernige	<8	%
Neutrophile Segmentkernige	36-84	%
Lymphozyten	20-42	%
Monozyten	<15 (3-5%)	%
Basophile Granulozyten	>1	%

Tabelle 6.25: **Referenzwerte für das Blutbild und die mikroskopische Differenzierung** nach dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Rostock

Parameter	Normbereich	Einheit
HSV-1 IgG AK	20-30	U/ml
HSV-1 IgG AK	positiv / negativ	
HSV-2 IgG AK	20-30	U/ml
HSV-2 IgG AK	positiv / negativ	
HSV 1-2 IgM AK	positiv / negativ	
VZV IgG AK	50.0-100.0	U/ml
VZV IgM AK	positiv / negativ	
HIV AG/AB-Combo	positiv /negativ	

Tabelle 6.26: **Referenzwerte für die Serologie** nach dem Institut für Mikrobiologie und Virologie der Universität Rostock

6.7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
a	Zeitpunkt akut
AEC Tablette	3-Amino-9-Ethylcarbozole Tablets
AK	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
APC	antigen presenting cells
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	bowine serum albumine
C	Cervikale Dermatome
CD	cluster of differentiation
CML	chronisch myeloische Leukämie
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds DNA	doublestrand desoxyribonukleinacid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E-Gene	early genes
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ELISPOT-Assay	enzyme linked immunospot assay
Fab-Teil	antigenbindendes Fragment
FACS	fluorescence activated cell sorting
FMA	Fluoreszenz Antikörper Membran Antigen Test
FCS	Fätales Kälberserum
Fc-Teil	crystallinisierbares Fragment
Ger	german
Hb	Hämoglobin
HBG-Detektor	Hämoglobin Detektor
HIV	human immunodeficient virus
Hk	Hämatokrit
HLA	human leucocyte antigen
HRPO	horse-radish-Peroxidase

HS	Humanes Serum
HSV	Herpes simplex Virus
IE-Proteine	immediate early protein
IFAT	indirekter Fluoreszenzantikörpertest
IFT	Immunfluoreszenztest
IFSG	Infektions Schutz Gesetz
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
K	Kontroll-Patient
KBR	Komplementbindungsreaktion
Kontroll	Kontroll-Patient, also VZV-seropositiver Träger
L	Lumbale Dermatome
LDA	limiting dilution assay
L-Gene	late genes
LT	Lymphotoxin
m	männlich
MACS-Cell-Separation	magnetic-assisted cell sorting
MCH	mean corpuscular haemoglobin
MCHC	mean corpuscular haemoglobin concentration
MCV	mean corpuscular volume
MHC	major histocompatibility complex
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NT	Neutralisationstest
PBMC	peripher blood mononuclear cells
PCR	polymerase chain reaction
pfu	plaque forming unit
PHA	Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin
PMT	Photomultiplier tubes
P-Oka	parent Oka Stamm
RBC -Detektor	red blood cell detektor
RCF-Assay	responder cell frequency assay
RKI	Robert-Koch-Institut
RPMI	Roswell Park Memory Institute
SFC	Spotting forming cells
SENIEUR Protokoll	Senior European Protokoll
SLS	Sodium Lauryl Sulfat
STABW	Statistische Abweichung
SPSS	Statistical Products and Service Solutions
Th	Thorakale Dermatome
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zell-Antigenrezeptor
v1	Zeitpunkt nach vier Wochen
v2	Zeitpunkt nach sechs Monaten

VAS	Visuelle-Analogue-Schmerzskala
VZV	Varicella-Zoster Virus
VZV-Oka /V-Oka	Oka Vaccine Stamm
VZV-WT	VZV Wildtypen
w	weiblich
x0	Zeitpunkt 1. Untersuchung
Z	Zoster-Patient
Zoster- Pat.	Patient mit Herpes Zoster

Abbildungsverzeichnis

1.1	Foto Herpes Zoster im zervikalen Dermatome	8
1.2	Aufteilung der Lymphozyten Subpopulationen im Blut	15
1.3	Spiegel VZV-spezifische T-Zellen über das Lebenszeitalter	22
2.1	Übersicht Aufbau Untersuchungsprogramm	25
2.2	Prinzip der FACS-Analyse	27
2.3	Immunantwort auf Infektionskrankheiten	27
2.4	Prinzip des ELISPOT-Assay	31
2.5	Prinzip eines γ -Spot	32
2.6	Prinzip MACS- Separation	32
2.7	Foto der MACS-Cell-Separation	34
2.8	Beispiele einer Mikrotiterplatte	36
2.9	Foto des KS ELISPOT compact	37
2.10	Einstellung der Auswerte-Software	37
2.11	Fotos Spots	38
3.1	Datenverfügbarkeit Aktenstudium	42
3.2	Altersklassen im Aktenstudium	43
3.3	Geschlechtsverteilung im Aktenstudium	43
3.4	Betroffene Dermatome im Aktenstudium	44
3.5	Betroffene Dermatome nach Geschlecht im Aktenstudium	45
3.6	Anzahl betroffene Dermatome im Aktenstudium	46
3.7	Schmerzskala akut im Aktenstudium	46
3.8	Schmerzskala Verlauf im Aktenstudium	47
3.9	Verlauf der Lymphozyten bei Zoster-Patienten im Blutbild	48
3.10	Verlauf der Lymphozyten bei Kontroll-Patienten im Blutbild	49

3.11 Eosinophile Granulozyten im Blutbild	49
3.12 Verlauf eosinophile Granulozyten der Kontroll-Patienten im Blut- bild	50
3.13 Neutrophile Stabkernige im Blutbild	51
3.14 Verlauf neutrophile Stabkernige bei Kontroll-Patienten im Blutbild	51
3.15 Absolute Anzahl Gesamt-Lymphozyten im Immunstatus	52
3.16 Prozentuale Anzahl Gesamt-Lymphozyten im Immunstatus	53
3.17 Absolute Anzahl T-Lymphozyten im Immunstatus	54
3.18 Prozentuale Anzahl T-Lymphozyten im Immunstatus	54
3.19 Absolute Anzahl B-Lymphozyten im Immunstatus	55
3.20 Prozentuale Anzahl B-Lymphozyten im Immunstatus	56
3.21 Absolute Anzahl T-Suppressorzellen im Immunstatus	56
3.22 Prozentuale Anzahl T-Suppressorzellen im Immunstatus	57
3.23 Verlauf der T-Suppressorzellen bei Zoster-Patienten im Immun- status	58
3.24 Absolute Anzahl T-Helferzellen im Immunstatus	58
3.25 Prozentuale Anzahl T-Helferzellen im Immunstatus	59
3.26 Absolute Anzahl aktivierte T-Zellen im Immunstatus	60
3.27 Prozentuale Anzahl aktivierte T-Zellen im Immunstatus	60
3.28 Verlauf aktivierte T-Zellen der Zoster-Patienten im Immunstatus	61
3.29 Absolute Anzahl NK-Zellen (CD16+, CD56+) im Immunstatus .	62
3.30 Prozentuale Anzahl NK-Zellen (CD16+, CD56+) im Immunstatus	62
3.31 Verlauf NK-Zellen (CD16+, CD56+) der Zoster-Patienten im Im- munstatus	63
3.32 Absolute Anzahl NK-Zellen (CD3+, CD16+, CD56+) im Im- munstatus	64
3.33 Prozentuale Anzahl NK-Zellen (CD3+, CD16+, CD56+) im Im- munstatus	64
3.34 Verlauf NK-Zellen (CD3+, CD16+, CD56+) der Kontroll-Patienten	65
3.35 CD4/CD8-Ratio	65
3.36 VZV Immunglobulin G	66
3.37 VZV Immunglobulin G der Zoster-Patienten	67
3.38 VZV Immunglobulin M	68
3.39 ELISPOT-Assay SFC CD8-PBMC	70
3.40 ELISPOT-Assay SFC CD4-PBMC	70

3.41	ELISPOT-Assay SFC CD8-PBMC der Zoster-Patienten	71
3.42	ELISPOT-Assay SFC CD4-PBM der Zoster-Patienten	72
4.1	Voraussetzungen für einen suffizienten ELISPOT-Assay	76
4.2	Kinetik der T-Zellen bei antiviraler T-Zellantwort	90
4.3	Verlauf Antikörper bei Herpesviridae nach immunologischer Re- aktivierung	94
6.1	Patienteneinwilligung	103
6.2	Untersuchungsbogen Zeitpunkt akut/xo	104
6.3	Untersuchungsbogen Zeitpunkt nach vier Wochen	105
6.4	Untersuchungsbogen nach sechs Monaten	106

Tabellenverzeichnis

1.1	Komplikationen Herpes Zoster	9
1.2	Übersicht unspezifische und spezifische Immunität	14
1.3	Vor- und Nachteile Nachweisverfahren Varicella-Zoster Virus . . .	21
2.1	Signifikanzniveau	39
4.1	Übersicht Monozyten im Verlauf des Immunstatus	79
4.2	Cut-Off-Anwendung für ELISPOT-Assay	96
4.3	Reproduzierbarkeit ELISPOT-Assay	98
6.1	Datenerhebung Aktenstudium	107
6.3	Übersicht labormedizinischer Nachweismethoden Varicella-Zoster Virus	108
6.4	Erhobene Laborparameter in der Studie	109
6.6	Substrate des ELISPOT-Assay	111
6.8	Zusammenfassung Ergebnisse Aktenstudium	112
6.11	Zusammenfassung Untersuchungsbögen Studie qualitativ	114
6.10	Zusammenfassung Untersuchungsbögen Studie quantitativ	114
6.13	Zusammenfassung Ergebnisse Blutbilder	116
6.15	Geschlechtsspezifische Unterschiede im Blutbild	117
6.16	Zusammenfassung Ergebnisse Immunstatus	122
6.18	Zusammenfassung Ergebnisse Serologie	125
6.20	Zusammenfassung Ergebnisse ELISPOT-Assay VZV-spezifische CD4+T-Zellen	126
6.22	Zusammenfassung Ergebnisse ELISPOT-Assay VZV-spezifische CD8+T-Zellen	127
6.23	VZV-Gentypisierung	127
6.24	Referenzwerte Immunstatus	128
6.25	Referenzwerte Blutbild und mikroskoische Differenzierung	128
6.26	Referenzwerte Serologie	129

Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K. and A. H. Lichtmann: 2004, *Basic Immunology*. Elsevier.
- Adair, J. C., M. Gold, and R. E. Bond: 1994, 'Acyclovir neurotoxicity: clinical experience and review of the literature'. *South Med J* **87**, 1227–31.
- Allison, A. C.: 1972, 'Immune responses in persistent virus infections'. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)* **6**, 121–31.
- Ampofo, K., L. Saiman, P. LaRussa, S. Steinberg, P. Annunziato, and A. Gershon: 2002, 'Persistence of immunity to live attenuated Varicella vaccine in healthy adults'. *Clin Infect Dis* **34**, 774–9.
- Anthony, D. D., A. B. Post, H. Valdez, D. L. Peterson, M. Murphy, and P. S. Heeger: 2001, 'ELISPOT analysis of hepatitis C virus protein-specific IFN-gamma-producing peripheral blood lymphocytes in infected humans with and without cirrhosis'. *Clin Immunol* **99**, 232–240.
- Arvin, A.: 2005, 'Aging, immunity, and the Varicella-Zoster Virus'. *N Engl J Med* **352**, 2266–7.
- Arvin, A. M.: 2008, 'Humoral and cellular immunity to varicella-zoster virus: an overview'. *J Infect Dis* **197**, S58–60.
- Arvin, A. M. and C. M. Koropchak: 1980, 'Immunoglobulins M and G to varicella-zoster virus measured by solid-phase radioimmunoassay: antibody responses to varicella and herpes zoster infections'. *J Clin Microbiol* **12**, 367–374.
- Arvin, A. M., C. M. Koropchak, B. R. Williams, F. C. Grumet, and S. K. Fount: 1986, 'Early immune response in healthy and immunocompromised subjects with primary varicella-zoster virus infection'. *J Infect Dis* **154**, 422–9.
- Arvin, A. M., C. M. Koropchak, and A. E. Wittek: 1983, 'Immunologic evidence of reinfection with varicella-zoster virus'. *J Infect Dis* **148**, 200–5.
- Asanuma, H., M. Sharp, H. T. Maecker, V. C. Maino, and A. M. Arvin: 2000, 'Frequencies of memory T cells specific for varicella-zoster virus, herpes simplex virus, and cytomegalovirus by intracellular detection of cytokine expression'. *J Infect Dis* **181**, 859–66.
- Baadsgaard, O., R. Lindskov, and C. Geisler: 1987, 'Reduction of the number of immunocompetent cells in the acute stage of herpes zoster'. *Arch Dermatol Res* **279**, 374–378.

- Banz, K., S. Wagenpfeil, A. Neiss, A. Goertz, U. Staginnus, J. Vollmar, and P. Wutzler: 2003, 'The cost-effectiveness of routine childhood varicella vaccination in Germany'. *Vaccine* **21**, 1256–1267.
- Bharat, A., F. Barros, K. Narayanan, B. Borg, M. Lisker-Melman, S. Shenoy, J. Lowell, J. Crippin, W. Chapman, and T. Mohanakumar: 2008a, 'Characterization of virus-specific T-cell immunity in liver allograft recipients with HCV-induced cirrhosis'. *Am J Transplant* **8**, 1214–1220.
- Bharat, A., E. K. E, N. Steward, A. Aloush, RHachem, E. P. Trulock, G. A. Patterson, B. F. Meyers, and T. Mohanakumar: 2008b, 'Immunolgical link between primary graft dysfunction and chronic lung allograft rejection'. *Ann Thorac Surg* **86**, 189–97.
- Bharat, A., K. Narayanan, T. Street, R. C. Fields, N. Steward, A. Aloush, B. Meyers, R. Schuessler, E. P. Trulock, G. A. Patterson, and T. Mohnankumar: 2007, 'Early posttransplant inflammation promotes the development of alloimmunity and chronic human lung allograft rejection'. *Transplantation* **83**, 150–8.
- Biron, C. A.: 1997, 'Activation and function of natural killer cell responses during viral infections'. *Curr Opin Immunol* **9**, 24–34.
- Biron, C. A. and L. Brossay: 2001, 'NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections.'. *Curr Opin Immunol* **13**, 458–64.
- Biron, C. A., M. Dalod, and T. P. Salazar-Mather: 2002, *Immunology of infectious diseases*, Chapt. Innate Immunity and Viral Infections, pp. 139–60. S H E Kaufmann and A Sher and R Ahmed.
- Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. PCousens, and T. P. Salazar-Mather: 1999, 'Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines'. *Annu Rev Immunol* **17**, 189–220.
- Bishop, G. A., L. McCurry, S. A. Schwartz, and J. C. Glorioso: 1987, 'Activation of human natural killer cells by herpes simplex virus type 1-infected cells'. *Interviolog* **28**, 78–88.
- Boer, K., T. Deufel, and M. Reinhoefer: 2009, 'Evaluation of the XE-5000 for the automated analysis of blood cells in cerebrospinal fluid'. *Clin Biochem* **42**, 684–91.
- Bontems, P., F. Robert, A. V. Gossum, S. Cadranet, and FMascart: 2003, 'Helicobacter pylori modulation of gastric and duodenal mucosa T cell cytokine secretions in children compared with adults'. *Helicobacter* **8**, 216–226.
- Boyum, A.: 1976, 'Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages'. *Scand J Immunol* **5**, 9–15.
- Braun, R. P., L. G. Payne, and L. Dong: 2006, 'Characterization of the IFN-gamma T-cell responses to immediate early antigens in humans with genital herpes'. *Virol J* **5**, 3:54.

- Britten, C. M., R. GMeyer, T. Kreer, I. Drexler, T. Woelfel, and W. Herr: 2002, 'The use of HLA-A * 0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays'. *J Immunol Methods* **259**, 95–110.
- Broyer, M., M. T. Tete, G. Guest, M. F. Gagnadoux, and C. Rouzioux: 1997, 'Varicella and Zoster in children after kidney transplantation: a long-term results of vaccination'. *Pediatrics* **99**, 35–9.
- Buchbinder, S. P., M. H. Katz, N. A. Hessol, J. Y. Liu, M. OMalley, R. Underwood, and S. D. Holmberg: 1992, 'Herpes Zoster and human immunodeficiency virus infection'. *J Infect Dis* **166**, 1153–6.
- Bundschuh, G.: 1991, *Repetitorium immunologicum*. Gustav und Fischer.
- Callard, R. E. and A. J. H. Gearing: 1994, *The Cytokine FactsBook*. R E Callard and A J H Gearing.
- Caramori, G., A. Pandit, and A. Papi: 2005, 'Is there a difference between chronic airway inflammation in chronic severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease?'. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **5**, 77–83.
- Cauda, R., E. F. Prasthofer, A. B. Tilden, R. J. Whitley, and C. E. Grossi: 1987, 'T-cell imbalances and NK activity in varicella-zoster virus infections'. *Viral Immunol* **1**, 145–52.
- Chen, J. J., A. A. Gershon, Z. S. Li, O. Lungu, and M. D. Gershon: 2003, 'Latent and lytic infection of isolated guinea pig enteric ganglia by Varicella Zoster virus'. *J Med Virol* **70**, S71–S78.
- Cohrs, R. J., D. H. Gilden, and R. Mahalingam: 2004, 'Varicella Zoster virus latency, neurological disease and experimental models: update'. *Front Biosci* **9**, 751–62.
- Comin-Anduix, B., Y. Lee, J. Jalil, A. Algazi, P. de la Rocha, L. H. Camacho, V. A. Bozon, C. A. Bulanhagui, E. Seja, A. Villanueva, B. R. Straatsma, A. Gualberto, J. S. Economou, J. A. Glaspy, J. Gomez-Navarro, and A. Ribas: 2008, 'Detailed analysis of immunologic effects of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4-blocking monoclonal antibody tremelimumab in peripheral blood of patients with melanoma'. *J Transl Med* **1**, 6:22.
- Cui, Y. and L. J. Chang: 1997, 'Computer-assisted, quantitative cytokine enzyme-linked immunospot analysis of human immune effector cell function'. *Biotechniques* **22**, 1146–1149.
- Czerkinsky, C., G. Andersson, H. P. Ekre, L. A. Nilsson, L. Klareskog, and O. Ouchterlony: 1988, 'Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production'. *J Immunol Methods* **110**, 29–36.
- Czerkinsky, C. C., L. A. Nilsson, H. Nygren, O. Ouchterlony, and A. Tarkowski: 1983, 'A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells'. *J Immunol Methods* **65**, 109–121.
- Dale, D. C.: 2009, 'Neutrophil biology and the next generation of myeloid growth factors.'. *J Natl Compr Canc Netw* **7**, 92–8.

- de Andrade, D. R., S. A. dos Santos, and D. R. de Andrade: 2008, 'Measurment of peripheral blood mononuclear cells producing IFN-gamma in patients with tuberculosis'. *Braz J Infect Dis* **12**, 123–127.
- Desombere, I., F. Clement, H. Rigole, and G. Leroux-Roels: 2005, 'The duration of in vitro stimulation with recall antigens determines the subset distribution of interferon-gamma-producing lymphoid cells: a kinetic analysis using the Interferon-gamma Secretion Assay'. *J Immunol Methods* **301**, 124–39.
- Distler, E., E. Schnitzler, E. Wagner, C. von Auer, B. Plachter, D. Wehler, C. Huber, K. Kolbe, R. G. Meyer, and W. H. W: 2008, 'Recovery of varicella-zoster virus-specific T cell immunity after T cell-depleted allogeneic transplantation requires symptomatic virus reactivation'. *Biol Blood Marrow Transplant* **14**, 1417–24.
- Doerner, K.: 2006, *Klinische Chemie und Haematologie*. Thieme.
- Doerr, H. W., M. Rentschler, and G. Scheiffler: 1987, 'Serologic detection of active infections with human herpes viruses (CMV, EBV, HSV, VZV): diagnostic potential of IgA class and IgG subclass-specific antibodies'. *Infection* **15**, 93–8.
- Dokun, A. O., D. Chu, L. Yang, A. S. Bendelac, and W. M. Yokoyama: 2001, 'Analysis of in situ NK cell responses during viral infection'. *J Immunol* **167**, 5286–93.
- Dorman, S. E. and S. M. Holland: 2000, 'Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease'. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**, 321–33.
- Dworkin, R. H., G. Hartstein, H. L. Rosner, R. R. Walther, E. W. Sweeney, and L. Brand: 1992, 'A high-risk method for studying psychosocial antecedents of chronic pain: the prospective investigation of Herpes Zoster'. *J Abnorm Psychol* **101**, 200–5.
- Dworkin, R. H., R. W. Johnson, J. Breuer, J. W. Gnann, M. J. Levin, M. Backonja, R. F. Betts, A. A. Gershon, M. L. Haanpaa, M. W. McKendrick, T. J. Nurmikko, A. L. Oaklander, M. N. Oxman, D. Pavan-Langston, K. L. Petersen, M. C. Rowbotham, K. E. Schmader, B. R. Stacey, S. K. Tyring, A. J. van Wijck, M. S. Wallace, S. W. Wassilew, and R. J. Whitley: 2007, 'Recommendations for the management of herpes zoster.'. *Clin Infect Dis* **44**, S1–26.
- Eriksson, K., I. Nordstoem, P. Horal, S. Jeansson, B. Svennerholm, A. Vuhline, J. Holmgren, and C. Czerkinsky: 1992, 'Amplified ELISPOT assay for the detection of HIV-specific antibody-secreting cells in subhuman primates'. *J Immunol Methods* **153**, 107–113.
- Eshofonie, A., M. Shim, M. S. van der Loeff, H. Whittle, and A. Jaye: 2006, 'An adaptation of recombinant vaccinia-based ELISPOT and intracellular cytokine staining for a comparative measurement of cellular immune responses in HIV-1 and HIV-2 infections in West Africa'. *Clin Exp Immunol* **146**, 471–478.

- Folkers, E., J. Vreeswijk, A. P. Oranje, and J. N. Duivenvoorden: 1989, 'Rapid diagnosis in varicella and herpes zoster: re-evaluation of direct smear (Tzanck test) and electron microscopy including colloidal gold immuno-electron microscopy in comparison with virus isolation'. *Br J Dermatol* **121**(3), 287–96.
- Fondere, J. M., J. F. Planas, M. F. Huguet, V. Baillat, F. Bolos, J. Reynes, and J. P. Vendrell: 2004, 'Enumeration of latently infected CD4+ T cell from HIV-1 infected patients using an HIV-1 antigen ELISPOT assay'. *J Clin Virol* **29**, 33–38.
- Fuks, L., D. Shitrit, B. D. Fox, A. Amital, Y. Raviv, I. Bakal, and M. Kramer: 2009, 'Herpes Zoster after lung transplantation: incidence, timing, and outcome'. *Ann Thorac Surg* **87**, 423–6.
- Galea, S. A., A. Sweet, P. Beninger, S. P. Steinberg, P. S. LaRussa, A. A. Gershon, and R. G. Sharrar: 2008, 'The safety profile of Varicella vaccine: a 10-year review'. *J Infect Dis* **197**, S165–9.
- Gebo, K. A., R. Kalyani, R. D. Moore, and M. J. Polydefkis: 2005, 'The incidence of, risk factors for, and sequelae of herpes zoster among HIV patients in the highly active antiretroviral therapy era.'. *J Acquir Immune Defic Syndr* **40**, 169–174.
- Gershon, A. A. and S. P. Steinberg: 1979, 'Cellular and humoral immune responses to varicella-zoster virus in immunocompromised patients during and after varicella-zoster infections'. *Infect. Immun* **25**, 170–4.
- Gershon, A. A., S. P. Steinberg, W. Borkowsky, D. Lennette, and E. Lennette: 1982, 'IgM to varicella-zoster virus: demonstration in patients with and without clinical zoster'. *Pediatr Infect Dis* **1**, 164–7.
- Godard, B., A. Gazagne, A. Gey, M. Baptiste, B. Vingert, B. Pegaz-Fiornet, L. S. L, W. H. Fridman, D. Glotz, and E. Tartour: 2004, 'Optimization of an Elispot assay to detect Cytomegalovirus-specific CD8+ T lymphocytes'. *Hum Immunol* **65**(11), 1307–1318.
- Goldman, G. S.: 2005, 'Cost-benefit analysis of universal varicella vaccination in the U.S. taking into account the closely related herpes-zoster epidemiology'. *Vaccine* **23**, 3349–3355.
- Gross, G. and H. W. Doerr: 2006a, 'Herpes Zoster - Recent aspects of diagnosis and control'. In: *Monographs in Virology Vol. 26*. Karger.
- Gross, G. and H. W. Doerr: 2006b, *Herpes Zoster - Recent aspects of diagnosis and control*, Chapt. Latency and reactivation of VZV, pp. 9–12. O Lungu and A A Gershon.
- Gross, G. and H. W. Doerr: 2006c, *Herpes Zoster- recent aspects of diagnosis and control*, Chapt. Laboratory Confirmation of Herpes Zoster, pp. 13–19. B Ludwig and S Buxbaum and H W Doerr.
- Gross, G., H. Schoefer, S. Wassilew, K. Friese, A. Timm, R. Guthoff, H. W. Pau, J. P. Malin, P. Wutzler, and H. W. Doerr: 2003, 'Herpes Zoster guideline of the German Dermatology Society (DDG)'. *J Clin Virol* **26**, 277–289.

- Hambleton, S., S. P. Steinberg, P. S. L. Russa, E. D. Shapiro, and A. A. Gershon: 2008, 'Risk of Herpes Zoster in adults immunized with Varicella vaccine'. *J Infect Dis* **197**, S196–9.
- Hannet, I., F. Erkeller-Yuksel, P. Lydyard, V. Deneys, and M. DeBruyere: 1992, 'Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations'. *Immunol Today* **13**, 215, 218.
- Harper, D. R., R. L. Gilbert, and D. J. Jeffries: 1998, 'Molecular biology of varicella-zoster virus. A review prepared for the UK Advisory Group on Chickenpox'. *J Infect* **36 Suppl 1**, 1–10.
- Hayward, A. R. and M. Herberger: 1987, 'Lymphocyte Responses to Varicella Zoster Virus in the Elderly'. *J Clin Immunol* **7**, 174–8.
- Hengel, H.: 2009, *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen*, Chapt. Varicella Zoster Virus, p. 867. Springer Berlin Heidelberg.
- Herr, W., B. Linn, N. Leister, E. Wandel, K. H. M. zum Bueschenfelde, and T. Woelfel: 1997, 'The use of computer-assisted video image analysis for the quantification of CD8+ T lymphocytes producing tumor necrosis factor alpha spots in response to peptide antigens'. *J Immunol Methods* **203(2)**, 141–52.
- Herr, W., J. Schneider, A. W. Lohse, K. H. M. zum Buechenfelde, and T. Woelfel: 1996, 'Detection and quantification of blood-derived CD8+ T lymphocytes secreting tumor necrosis factor cy in response HLA-A2.1 -binding melanoma and viral peptide antigens'. *J Immunol Methods* **191**, 131–142.
- Herzenberg, L. A., R. G. Sweet, and L. A. Herzengerg: 1976, 'Fluorescence-activated cell sorting'. *Sci Am* **234**, 108–17.
- Higa, K., B. Noda, H. Manabe, S. Sato, and K. Dan: 1992, 'T-lymphocyte subsets in otherwise healthy patients with herpes zoster and relationships to the duration of acute herpetic pain'. *Pain* **51**, 111–8.
- Hill, P. C., A. Fox, D. J. Jeffries, D. Jackson-Sillah, M. D. Lugos, P. K. Owiafe, S. A. Donkor, A. S. Hammond, T. Corrah, R. A. Adegbola, K. P. McAdam, and R. H. Brookes: 2005, 'Quantitative T cell assay reflects infectious load of Mycobacterium tuberculosis in an endemic case contact model'. *Clin Infect Dis* **40**, 273–8.
- Hirokawa, K., M. Utsuyama, M. Kasai, and C. Kurashima: 1992, 'Aging and Immunity'. *Acta Pathol Jpn* **42**, 537–48.
- Hocknell, P. K., R. D. Wiley, X. Wang, T. G. Evans, W. J. Bowers, T. Hanke, H. J. Federoff, and S. Dewhurst: 2002, 'Expression of human immunodeficiency virus type 1 gp120 from Herpes Simplex virus type 1-derived amplicons results in potent, specific, and durable cellular and humoral immune responses'. *J. Virol.* **76**, 5565–5580.
- Hosken, N., P. McGowan, A. Meier, D. M. Koelle, P. Sleath, F. Wagener, M. Elliott, K. Grabstein, C. Posavad, and L. Corey: 2006, 'Diversity of the CD8 T-cell response to Herpes Simplex virus type 2 proteins among persons with genital Herpes'. *J Virol* **90**, 5509–5515.

- Hricik, C. E., V. Rodriguez, J. Riley, K. Brayn, M. Tarry-Lehmann, N. S. Greenspan, C. DeJelo, J. A. Schulak, and P. S. Heeger: 2003, 'Enzyme linked immunosorbent spot (ELISPOT) assay for Interferon-gamma independently predicts renal function in kidney transplant recipients'. *Am J Transplant* **3**, 878–884.
- Huebener, E. A. L.: 1852, *Specielle Pathologie u. Therapie: Band 2*. Verlag von Ferdinand Enke, Erlangen.
- Hulstaert, F., I. Hannet, V. Deneys, V. Munhyeshuli, T. Reichert, M. D. Bruyere, and K. Strauss: 1994, 'Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. II. Varying kinetics of percentage and absolute count measurements'. *Clin Immunol Immunopathol* **70**, 152–8.
- Hutchings, P. R., G. Cambridge, J. P. Tite, T. Meager, and A. Cooke: 1989, 'The detection and enumeration of cytokine-secreting cells in mice and man and the clinical application of these assays'. *J Immunol Methods* **120**, 1–8.
- Inoue, M., S. Kakamu, K. Yoshioka, Y. Tsutsumi, T. Wakita, and M. Arao: 1989, 'Hepatitis B core antigen-specific IFN-gamma production of peripheral blood mononuclear cells in patients with chronic Hepatitis B virus infection'. *J Immunol* **142**, 4006–4011.
- Insinga, R. P., R. F. Itzler, J. M. Pellissier, P. Saddier, and A. A. Nikas: 2005, 'The incidence of herpes zoster in a United States administrative database'. *J Gen Intern Med* **20**(8), 748–53.
- Ito, M., T. Nakano, T. Kamiya, K. Kitamura, Y. Komada, T. Ihara, H. Kamiya, and M. Sakurai: 1992, 'Activation of lymphocytes by varicella-zoster virus (VZV): expression of interleukin-2 receptors on lymphocytes cultured with VZV antigen'. *J Infect Dis* **165**, 158–61.
- Izzedine, H., V. Launay-Vacher, and G. Deray: 2005, 'Antiviral drug-induced nephrotoxicity'. *Am J Kidney Dis* **45**, 804–17.
- Janetzki, S., J. H. Cox, N. Oden, and G. Ferrari: 2005, 'Standardization and validation issues of the ELISPOT assay'. *Methods Mol Biol* **302**, 51–86.
- Janetzki, S., K. S. Panageas, L. Ben-Porat, J. Boyer, C. M. Britten, T. M. Clay, M. Kalos, H. TMaecker, P. Romero, J. Yuan, W. M. Kast, and A. Hoos: 2008, 'Results and harmonization guidelines from two large-scale international Elispot proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI)'. *Cancer Immunol Immunother* **57**, 303–15.
- Janetzki, S., S. Schaed, N. E. Blachere, L. Ben-Porat, A. N. Houghton, and K. S. Panageas: 2004, 'Evaluation of Elispot assays: influence of method and operator on variability of results'. *J Immunol Methods* **291**, 175–183.
- Janeway, C. A., M. M. Kenneth, P. Travers, and M. Walport: 2007, *Janeway's Immunobiology*. C A Janeway.
- Jelinek, T.: 2012, *Kursbuch Reisemedizin: Beratung, Prophylaxe, Reisen mit Erkrankungen von Tomas Jelinek*. Thieme, Stuttgart.

- Jenkins, D. E., R. L. Redman, E. M. Lam, C. Liu, I. Lin, and A. M. Arvin: 1998, 'Interleukin (IL)-10, IL-12, and interferon-gamma production in primary and memory immune responses to varicella-zoster virus'. *J Infect Dis* **178**, 940–8.
- Johnson, R. W., G. Wasner, P. Saddier, and R. Baron: 2008, 'Herpes zoster and postherpetic neuralgia: optimizing management in the elderly patient'. *Drugs Aging* **12**, 991–1006.
- Jumaan, A. O., Y. Onchee, L. A. Jackson, K. Bohlke, K. Galil, and F. Seward: 2005, 'Incidence of Herpes Zoster, before and after Varicella-vaccination- associated decreases in the incidence of Varicella'. *J Infect Dis* **191**, 1999–2001.
- Kalyuzhny, A. E.: 2005, *Handbook of ELISPOT - methods and protocols*, Chapt. Chemistry and biology of the ELISPOT assay, pp. 15–31. A E Kalyuzhny.
- Kantari, C., M. Pederzoli-Ribeil, and V. Witko-Sarsat: 2008, 'The role of neutrophils and monocytes in innate immunity'. *Contrib Microbiol* **15**, 118–46.
- Karlsson, A. C., J. N. Martin, S. R. Younger, B. M. Bredt, L. Epling, R. Ronquillo, A. Varma, S. G. Deeks, J. M. McCune, D. F. Nixon, and E. Sinclair: 2003, 'Comparison of the ELISPOT and cytokine flow cytometry assays for the enumeration of antigen-specific T cells'. *J Immunol Methods* **283**(1-2), 141–53.
- Kaspar, F.: 1968, 'Current status of immunosuppression'. *Dtsch Med J* **7**, 211–13.
- Kempf, W. and S. Lautenschlager: 2001, 'Infektionen mit dem Varizella-Zoster-Virus'. *Hautarzt* **52**, 359–376.
- Khan, N., M. C. M. R. Keenan, and P. A. H. Moss: 2002, 'Comperative analysis of CD8+ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype'. *J Infect Dis* **185**, 1025–34.
- Khera, P., J. M. Haught, J. McSorley, and J. C. English: 2009, 'Atypical presentations of herpesvirus infections in patients with chronic lymphocytic leukemia'. *J Am Acad Dermatol* **60**, 484–6.
- Khvedelidze, M., N. Chkhartishvili, L. Abashidze, L. Dzigua, and T. Tsertsvadze: 2008, 'Expansion of CD3/CD16/CD56 positive NKT cells in HIV/AIDS: the pilot study'. *Georgian Med News* **165**, 78–83.
- Kiessling, A., M. Schmitz, S. Stevanovic, B. Weigle, K. Hoelig, M. Fuessel, S. Fuessel, A. Mey, M. P. Wirth, and E. P. Rieber: 2002, 'Prostate stem cell antigen: identification of immunogenic peptides and assesment of reactive CD8+ T-cells in prostate cancer patients'. *Int J Cancer* **102**, 309–397.
- Kim, S. H., E. J. Oh, M. J. Kim, Y. J. Park, K. Han, H. J. Yang, J. Y. Kim, B. S. Choi, C. W. Yang, Y. S. Kim, and B. K. Bang: 2007, 'Pretransplant donor-specific interferon-gamma ELISPOT assay predicts acute rejection episodes in renal transplant recipients'. *Transplant Proc* **39**, 3057–3060.
- Kost, R. G. and S. E. Straus: 1996, 'Drug therapy: postherpetic neuralgia - pathogenesis, treatment and prevention'. *N Engl J Med* **335**, 32–42.

- Kreher, C. R., M. T. Dittrich, R. Guerkov, B. O. Boehm, and M. Tary-Lehmann: 2003, 'CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays'. *J Immunol Methods* **278**, 79–93.
- Krentz, H.: 2005, *Statistische Analysen mit SPSS in der Medizin*. Shaker Verlag.
- Krishna, S., P. Benaroch, and S. Pillai: 1992, 'Tetrameric cell-surface MHC class I molecules'. *Nature* **357**, 164–7.
- Lafer, M. M., L. Y. Weckx, M. I. de Moraes-Pinto, A. Garretson, S. P. Steinberg, A. A. Gershon, and P. S. LaRussa: 2011, 'Comparative Study of the Standard Fluorescent Antibody to Membrane Antigen (FAMA) Assay and a Flow Cytometry-Adapted FAMA Assay To Assess Immunity to Varicella-Zoster Virus'. *Clin. Vaccine Immunol* **18**(7), 1194–1197.
- Lalvani, A., R. Brookes, S. Hambleton, W. J. Britton, A. V. Hill, and A. J. McMichael: 1997, 'Rapid effector function in CD8+ memory T cells'. *J Exp Med* **186**, 859–65.
- Lemiere, C.: 2004, 'The use of sputum eosinophils in the evaluation of occupational asthma.'. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **4**, 81–5.
- Levin, M. J., M. N. Oxman, J. H. Zhang, G. R. Johnson, H. Stanley, A. R. Hayward, M. J. Caulfield, M. R. Irwin, J. G. Smith, J. Clair, I. S. F. Chan, H. Williams, R. Harbecke, R. Marchese, S. E. Straus, A. Gershon, and A. Weinberg: 2008, 'Varicella-Zoster virus-specific immune responses in elderly recipients of a Herpes Zoster vaccine'. *J Infect Dis* **197**, 825–35.
- Levin, M. J., J. G. Smith, R. M. Kaufhold, D. Barber, A. R. Hayward, C. Y. Chan, I. S. F. Chan, D. J. Li, W. Wang, P. M. Keller, A. Shaw, J. L. Silber, K. Schlienger, I. Chalikonda, S. J. R. Vessey, and M. J. Caulfield: 2003, 'Decline in Varicella-Zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity with increasing age and boosting with a high-dose VZV vaccine'. *J Infect Dis* **188**, 1336–44.
- Lewis, J., S. Janetzki, S. Schaed, K. Panageas, S. Wang, L. Williams, M. Meyers, L. Butterworth, P. Livingston, P. Chapman, and A. Houghton: 2000, 'Evaluation of CD8(+) T-cell frequencies by the Elispot assay in healthy individuals and in patients with metastatic melanoma immunized with tyrosinase peptide.'. *Int J Cancer* **87** (3), 391–8.
- Ligthart, G. J., J. X. Corberand, C. Fournier, P. Galanaud, W. Hijmans, B. Kennes, H. K. Mueller-Hermelink, and G. G. Steinmann: 1984, 'Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol'. *Mech Ageing Dev* **28**, 47–55.
- Ligthart, G. J., P. C. van Vlokhoven, H. R. Schuit, and W. Hijmans: 1986, 'The expanded null cell compartment in ageing: increase in the number of natural killer cells and changes in T-cell and NK-cell subsets in human blood'. *Immunology* **59**, 353–7.
- Lisse, I. M., K. Qureshi, A. Poulsen, P. E. Kofoed, J. Nielsen, B. F. Vestergaard, and P. Aaby: 2005, 'T-lymphocyte subsets and eosinophil counts in acute and convalescence chickenpox infection: a household study in Guinea-Bissau'. *J Infect* **50**, 125–9.

- Liu, F. F., X. Y. Dong, X. W. Pang, Q. Xing, H. C. Wang, H. G. Zhang, Y. Li, Y. H. Yin, M. F. M. D. J. Ye, D. H. Shen, Y. Zhang, S. Wang, and W. F. Chen: 2008, 'The specific immune response to tumor antigen CP1 and its correlation with improved survival in colon cancer patients'. *Gastroenterology* **134**, 998–1006.
- Loeffler, G.: 2000, *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Springer.
- Loparev, V. N., A. Gonzalez, M. Deleon-Carnes, G. Tipples, H. Fickenscher, E. G. Torfason, and D. S. Schmid: 2004, 'Global identification of three major genotypes of varicella-zoster virus: longitudinal clustering and strategies for genotyping'. *J Virol* **78**, 8349–58.
- Loparev, V. N., E. N. Rubtcova, V. Bostik, D. Govil, C. J. Birch, J. D. Druce, D. S. Schmid, and M. C. Croxson: 2007, 'Identification of five major and two minor genotypes of varicella-zoster virus strains: a practical two-amplicon approach used to genotype clinical isolates in Australia and New Zealand'. *J Virol* **81**, 12758–65.
- Loparev, V. N., E. N. Rubtcova, V. Bostik, V. Tzaneva, A. Sauerbrei, A. Robo, E. Sattler-Dornbacher, I. Hanovcova, V. Stepanova, M. Splino, V. Eremin, M. Koskiniemi, O. E. Vankova, and D. S. Schmid: 2009, 'Distribution of varicella-zoster virus (VZV) wild-type genotypes in northern and southern Europe: evidence for high conservation of circulating genotypes.'. *Virology* **383**, 216–225.
- Lotfian, P., M. S. Levy, R. S. Coffin, T. Fearn, and P. Ayazi-Shamlou: 2003, 'Impact of process conditions on the centrifugal recovery of a disabled herpes simplex virus'. *Biotechnol Prog* **19**, 209–15.
- Lungu, O., P. W. Annunziatio, A. Gershon, S. M. Staugaitis, D. Josefson, P. LaRussa, and P. J. Silverstein: 1995, 'Reactivated and latent Varicella Zoster virus in human dorsal root ganglia'. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10980–10984.
- Maecker, H. T., J. Hassler, J. K. Payne, A. Summers, K. Comatas, M. Ghanayem, M. A. Morse, T. M. Clay, H. K. Lyster, S. Bhatia, S. A. Ghanekar, V. C. Maino, C. Delarosa, and M. L. Disis: 2008, 'Precision and linearity targets for validation of an IFN gamma ELISPOT, cytokine flow cytometry, and tetramer assay using CMV peptides'. *BMC Immunol* **17**, 9:9.
- Mahmoud, A.: 1982, 'The ecology of eosinophils in schistosomiasis'. *J Infect Dis* **145**, 613–22.
- Makinodan, T. and M. M. Kay: 1980, 'Age influence on the immune system'. *Adv Immunol* **29**, 287–330.
- Male, D.: 2005, *Immunologie auf einen Blick*. Urban und Fischer.
- Malkusch, W.: 2005, *Handbook of ELISPOT - methods and protocols*, Chapt. High resolution as a key feature to perform accurate ELISPOT measurements using Zeiss KS ELISPOT readers, pp. 133–150. A E Kalyuzhny.

- Mann, H. B. and D. R. Whitney: 1947, 'On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other'. *Ann Math Stat* pp. 50–60.
- Masseyeff, R. F., W. H. Albert, and N. A. Staines: 1993, *Methods of Immunological Analysis, Volume 3, Cells and Tissues*, Chapt. Enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assays for detection of specific antibody-secreting cells, pp. 504–540. C Czerkinsky and J Sedgwick.
- Mckean, M. C., C. Hewitt, P. C. Lambert, S. Myint, and M. Silverman: 2003, 'An adult model of exclusive viral wheeze: inflammation in the upper and lower respiratory tracts'. *Clin Exp Allergy* **33**, 912–20.
- Meiklejohn, D. A., R. K. Karlsson, A. C. Karlsson, J. M. Chapman, D. F. Nixon, and B. Schweighardt: 2004, 'ELISPOT cell rescue'. *J Immunol Methods* **288**, 135–147.
- Meister, W., A. Neiss, G. Gross, H. W. Doerr, W. Hoebel, J. P. Maline, J. von Essen, B. Y. Reiman, C. Witke, and P. Wutzler: 1998, 'Demography, symptomatology, and course of disease in ambulatory Zoster patients'. *Intervirology* **41**, 272–277.
- Miltenyi, S., W. Mueller, W. Weichel, and A. Radbruch: 1990, 'High gradient magnetic cell separation with MACS'. *Cytometry* **11**, 231–238.
- Minang, J. T., I. Arestroem, M. Troye-Blomberg, L. Lundeberg, and N. Ahlborg: 2006, 'Nickel, cobalt, chromium, palladium and gold induce a mixed Th1- and Th2-type cytokine response in vitro subjects with contact allergy to the respective metals'. *Clin Exp Immunol* **146**, 417–426.
- Mittler, J. N. and W. T. Lee: 2004, 'Antigen-specific CD4 T cell clonal expansion and differentiation in the aged lymphoid microenvironment. I. The primary T cell response is unaffected'. *Mech Ageing Dev* **125**, 47–57.
- Miura, D., V. N. Dobrovolsky, R. A. Mittelstaedt, Y. Kasahara, Y. Katsuura, and R. H. Heflich: 2008, 'Development of an in vivo gene mutation assay using the endogenous Pig-A gene: II. Selection of Pig-A mutant rat spleen T-cells with proaerolysin and sequencing Pig-A cDNA from the mutants'. *Environ Mol Mutagen* **49**, 622–30.
- Nagel, J. E., F. J. Chrest, and W. H. Adler: 1981, 'Enumeration of T lymphocyte subsets by monoclonal antibodies in young and aged humans.'. *J Immunol* **127**, 2086–8.
- Nagel, J. E., F. J. Chrest, R. S. Pyle, and W. H. Adler: 1983, 'Monoclonal antibody analysis of T-lymphocyte subsets in young and aged adults'. *Immunol Commun* **12**, 223–237.
- Nagler, F. and G. Rake: 1948, 'The Use of the Electron Microscope in Diagnosis of Variola, Vaccinia, and Varicella'. *J Bacteriol* **55**(1), 45–51.
- Namazue, J., T. Kato, K. Yamanishi, M. Takahashi, Y. Asano, and R. Muraki: 1986, 'Antibody responses to early antigens of varicella-zoster virus (VZV) during varicella and zoster'. *Biken J* **29**, 91–7.

- Niemer, M. A.: 2014, 'In vitro Untersuchungen allergenspezifischer T-Zellen mittels ELISpot-Assay bei der Spaettypallergie gegen Betalaktam-Antibiotika'. Ph.D. thesis.
- Norberg, P.: 2010, 'Divergence and genotyping of human alpha-herpesviruses: An overview.'. *Infect Genet Evol* **10**, 14–25.
- Notkins, A. L., S. E. Mergenhagen, and R. J. Howard: 1970, 'Effect of virus infections on the function of the immune system'. *Annu Rev Microbiol* **24**, 525–38.
- OBeirne, A. J. and H. R. Cooper: 1979, 'Heterogeneous enzyme immunoassay'. *J Histochem Cytochem* **27**, 1148–62.
- Oethinger, M.: 2004, *Kurzlehrbuch Mikrobiologie und Immunologie*. Urban und Fischer.
- Okamoto, Y., T. Abe, T. Niwa, S. Mizuhashi, and M. Nishida: 1998, 'Development of a dual color enzyme-linked immunospot assay for simultaneous detection of murine T helper type 1- and T helper type 2-cells'. *Immunopharmacology* **39**, 107–116.
- Otto, K., M. H. Andersen, A. Eggert, P. Kieikavoussi, L. O. Pedersen, J. C. Rath, M. Boeck, E. B. Broecker, P. Straten, E. Kaempgen, and J. C. Becker: 2005, 'Lack of toxicity of therapy-induced T cell responses against the universal tumour antigen survivin'. *Vaccine* **23**, 884–889.
- Ouyang, Q., W. M. Wagner, A. Wikby, E. Remarque, and G. Pawelec: 2002, 'Compromised interferon gamma (IFN-gamma) production in the elderly to both acute and latent viral antigen stimulation: contribution to the immune risk phenotype?'. *Eur Cytokine Netw* **13**, 392–4.
- Oxman, M. N. and M. J. Levin: 2008, 'Vaccination against Herpes Zoster and postherpetic neuralgia'. *J Infect Dis* **197**, S228–36.
- Oxman, M. N., M. J. Levin, G. R. Johnson, K. E. Schmader, M. D. Straus, and M. D. Gelb: 2005, 'A vaccine to prevent Herpes Zoster and postherpetic neuralgia in older adults'. *N Engl J Med* **352**, 2271–2284.
- Ozcan, A., M. Senol, H. Saglam, M. Seyhan, R. Durmaz, E. Aktas, and I. H. Ozerol: 2007, 'Comparison of the Tzanck test and polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous herpes simplex and varicella zoster virus infections'. *Int J Dermatol* **46**(11), 1177–9.
- Peritz, D. C., C. Duncan, K. Kurek, A. R. Perez-Atayde, and L. E. Lehmann: 2008, 'Visceral Varicella Zoster virus (VZV) after allogeneic hematopoietic stem cell transplant (HSCT) in pediatric patients with chronic graft-versus-host disease (cGVHD)'. *J Pediatr Hematol Oncol* **30**, 931–4.
- Qiu, Q., N. W. Todd, R. Li, H. Peng, Z. Liu, H. G. Yfantis, R. L. Katz, S. A. Stass, and F. Jiang: 2008, 'Magnetic enrichment of bronchial epithelial cells from sputum for lung cancer diagnosis'. *Cancer* **114**, 275–283.

- Quan, D., R. J. Cohrs, R. Mahalingam, and D. H. Gilden: 2007, 'Prevention of shingles: safety and efficacy of live zoster vaccine'. *Ther Clin Risk Manag* **3**, 633–639.
- Quinlivan, M. and J. Breuer: 2006, 'Molecular studies of Varicella zoster virus'. *Rev Med Virol* **16**, 225–40.
- R. Baukholt, B.-H. S. G.: 2008, 'Untersuchungen zur zellulären Immunität bei Patienten mit Herpes Zoster und Kontrollpersonen'.
- Ragozzino, M. W., L. J. Meltion, L. T. Kurland, C. P. Chu, and H. O. Perry: 1982, 'Population based study of Herpes Zoster and its sequelae'. *Medicine (Baltimore)* **61**, 310–6.
- Ragozzino, M. W., L. J. Melton, and L. T. Kurland: 1983, 'Herpes zoster and diabetes mellitus: an epidemiological investigation'. *J Chronic Dis* **361**, 501–5.
- Ramaswamy, M., A. Waters, C. Smith, E. Hainsworth, G. Hardy, M. Johnson, J. Ainsworth, A. Phillips, and A. M. Geretti: 2007, 'T reconstitution of Herpes Simplex virus-specific T cell immunity in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy'. *J Infect Dis* **195**, 410–5.
- Reichert, T., M. DeBruyere, V. Deneys, T. Toettermann, P. Lydyard, F. Yuksel, H. Chapel, D. Jewell, L. V. Hove, and J. Linden: 1991, 'Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians'. *Clin Immunol Immunopathol* **60**, 190–208.
- Rink, L., I. Cakman, and H. Kirchner: 1998, 'Altered cytokine production in the elderly'. *Mech Ageing Dev* **102**, 199–209.
- Robert-Koch-Institut: 2004, 'Varizellen'. *Epid Bull* **49**, 1–12.
- Robert-Koch-Institut: 2013, 'Ratgeber für Ärzte: Varizellen (Windpocken), Herpes zoster (Gürtelrose)'. Internet.
- Roennelid, J. and L. Klareskog: 1997, 'A comparison between ELISPOT methods for the detection of cytokine producing cells: greater sensitivity and specificity using ELISA plates as compared to nitrocellulose membranes'. *J Immunol Methods* **200**, 17–26.
- Russell, A. S., R. A. Maini, M. Bailey, and D. C. Dumonde: 1973, 'Cell-mediated immunity to Varicella-Zoster antigen in acute Herpes zoster (shingles)'. *Clin Exp Immunol* **14**, 181–5.
- Rusthoven, J. J., P. Ahlgren, T. Elhakim, P. Pinfold, L. Stewart, and R. Feld: 1988, 'Risk factors for Varicella Zoster disseminated infection among adult cancer patients with localized Zoster'. *Cancer* **62**, 1641–1646.
- Sadaoka, K., S. Okamoto, Y. Gomi, T. Tanimoto, T. Ishikawa, T. Yoshikawa, Y. Asano, K. Yamanishi, and Y. Mori: 2008, 'Measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity: comparison between VZV skin test and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay'. *J Infect Dis* **198**, 1327–33.

- Sanosi, P., R. Vescovini, F. Fagnoni, C. Biasini, F. Zanni, L. Zanlari, A. Telera, G. Lucchini, G. Passeri, D. Monti, C. Franceschi, and M. Passeri: 2008, 'The immune system in extreme longevity'. *Exp Gerontol* **43**, 61–65.
- Sarawar, S. R., S. R. Carding, W. A. A. M. Mickle, K. Fujihashi, H. Kiyono, J. R. M. Ghee, and P. C. Doherty: 1993, 'Cytokine profiles of bronchoalveolar lavage cells from mice with Influenza pneumonia: consequences of CD4+ and CD8+ T cell depletion'. *Reg Immunol* **5**, 142–150.
- Sauerbrei, A., U. Eichhorn, and M. S. et al.: 1999a, 'Laboratory diagnosis of herpes zoster'. *J Clin Virol* **14**, 31–6.
- Sauerbrei, A., M. Sommer, and P. Wutzler: 1999b, 'Virologische Diagnostik des Herpes Zoster'. *Hautarzt* **50**, 873–878.
- Sauerbrei, A. and P. Wutzler: 2007, 'Different genotype pattern of varicella-zoster virus obtained from patients with varicella and zoster in Germany'. *J Med Virol* **79**, 1025–31.
- Sauerbrei, A., R. Zell, A. Philipps, and P. Wutzler: 2008, 'Genotypes of varicella-zoster virus wild-type strains in Germany'. *J Med Virol* **80**, 1123–30.
- Schaed, S. G., V. M. Klimek, K. S. Panageas, C. M. Musselli, L. Butterworth, W. J. Hwu, P. O. Livingston, L. Williams, J. J. Lewis, A. N. Houghton, and P. B. Chapman: 2002, 'T-cell response against Tyrosinase 368-376(370D) peptide in HLA*A0201+ melanoma patients: randomized trial comparing incomplete freund's adjuvant, granulocyte macrophage Colony-stimulating Factor, and QS-21 as immunological adjuvants'. *Clin Cancer Res* **8**, 976–972.
- Schaed S.G, Ebert R., K. H. G. G.: 2011, 'Messungen der zellulären und spezifischen Immunität bei Patienten mit Herpes Zoster im Vergleich zu alters- und geschlechtsangepassten Varizella-Zoster-Virus (VZV)-seropositive Kontrollpersonen'.
- Scheibenbogen, C., K. H. Lee, S. Stevanovic, M. Witzens, M. Willhauck, V. Waldmann, H. Naehrer, H. G. Rammensee, and U. Keilholz: 1997, 'Analysis of the T cell response to tumor and viral peptide antigens by an IFN-gamma-ELISPOT assay'. *Int J Cancer* **71**, 932–936.
- Schmader, K., J. G. Gnann, and C. P. Watson: 2008, 'The epidemiological, clinical, and pathological rationale for the Herpes Zoster Vaccine'. *J Infect Dis* **197**, S207–15.
- Schmid, D. S., M. L. Thieme, and H. E. G. J. W. C. Reeves: 1997, 'Characterization of T cell responses to herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and herpes simplex virus type 2 (HSV-2) using a TNF-beta ELISPOT cytokine assay'. *Arch Virol* **142**, 1659–1671.
- Schmidt-Chanasit, J., K. Bleymehl, S. G. Schaed, G. Gross, R. G. Ulrich, and H. W. Doerr: 2008, 'Novel Varicella-Zoster virus glycoprotein E gene mutations associated with genotypes A and D'. *J Clin Microbiol* **46**, 325–327.

- Schmidt-Chanasit, J., M. Stuermer, A. Hahn, S. G. Schaed, G. Gross, R. G. Ulrich, G. Heckel, and H. W. Doerr: 2007, 'Novel approach for genotyping Varicella-Zoster virus strains from Germany'. *J Clin Microbiol* **45**, 3540–3545.
- Schmittel, A., U. Keilholz, and C. Scheibenbogen: 1997, 'Evaluation of the interferon gamma ELISPOT-assay for quantification of peptide specific T lymphocytes from peripheral blood'. *J Immunol Methods* **210**, 167–174.
- Schub, D., E. Janssen, S. Leyking, U. Sester, G. Assmann, P. Hennes, S. Smola, T. Vogt, T. Rohrer, M. Sester, and T. Schmid: 2014, 'Altered Phenotype and Functionality of Varicella Zoster Virus-Specific Cellular Immunity in Individuals With Active Infection'. *J Infect Dis* **Epub ahead of print**.
- Schwitalle, Y., M. Kloor, S. Eiermann, M. Linnebacher, P. Kienle, H. P. Knaebel, M. Tariverdian, A. Benner, and M. von Knebel Doerberitz: 2008, 'Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers'. *Gastroenterology* **134**, 988–997.
- S.G.Schaed, R. Baukholt, H. J. B. M.-H. G. G.: 2008, 'T cell-mediated immunity differs significantly in patients with herpes zoster in comparsion to age- and gender-matched controls'.
- Siedler, A., J. Hecht, T. Rieck, K. Tolksdorf, and S. V. H Hengel Bundesgesundheitsbl 22013, 56:13:3-1320: 2013. *Bundesgesundheitsblatt* **56**, 13:3–1320.
- Sjoewall, J., A. Carlsson, O. Vaarala, S. Bergstroem, J. Ernerudh, P. Forsberg, and C. Ekerfelt: 2005, 'Innate immune responses in Lyme borreliosis: enhanced tumor necrosis factor-alpha and interleukin-12 in asymptomatic individuals in response to live spirochetes'. *Clin Exp Immunol* **141**, 89–98.
- Smith, J. G., H. R. Joseph, T. Green, J. A. Field, M. Wooters, R. A. Kaufhold, J. Antonello, and M. J. Caulfield: 2007, 'Establishing acceptance criteria for cell-mediated-immunity assays using frozen peripheral blood mononuclear cells stored under optimal and suboptimal conditions'. *Clin Vaccine Immunol* **14**, 527–37.
- Smith, J. G., M. Levin, R. Vessey, I. S. F. Chan, A. R. Hayward, X. Liu, R. M. Kaufhold, J. Clair, I. Chalikonda, C. Chan, M. Bernard, W. W. Wang, P. Keller, and M. J. Caulfield: 2003, 'Measurment of cell-mediated immunity with a Varicella-Zoster virus-specific Interferon-gamma ELISPOT Assay: responses in an elderly population receiving a booster immunization'. *J Med Virol* **70**, S38–S41.
- Smith, J. G., X. Liu, R. M. Kaufhold, J. Clair, and M. J. Caulfield: 2001, 'Development and validation of a gamma Interferon ELISPOT assay for quantitation of cellular immune responses to Varicella-Zoster virus'. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 871–879.
- Solana, R. and E. Mariani: 2000, 'NK and NK/T cells in human senescence'. *Vaccine* **18**, 1613–20.

- Sun, Y., E. Iglesias, A. Samri, G. Kamkamidze, T. Decoville, G. Carcelain, and B. Autran: 2003, 'A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8 T cells'. *J Immunol Methods* **272**, 23–34.
- Suzuki, T., T. Sakane, and E. G. Engleman: 1990, 'Anti-DNA antibody production by CD5+ and CD5- B cells of patients with systemic lupus erythematosus'. *J Clin Invest* **85**, 238–247.
- Szomolanyi-Tsuda, E., M. A. Brehm, and R. M. Welsh: 2002, *Immunology of infectious diseases*, Chapt. Acquired immunity against viral infections, pp. 247–265. S H E Kaufmann and A Sher and R Ahmed.
- Taguchi, T., J. R. McGhee, R. L. Coffman, K. W. Beagley, J. H. Eldridge, K. Takatsu, and H. Kiyono: 1990, 'Detection of individual mouse splenic T cells producing IFN-gamma and IL-5 using the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay'. *J Immunol Methods* **128**, 65–73.
- Takahashi, M., Y. Asano, H. Kamiya, K. Baba, T. Ozaki, T. Otsuka, and K. Yamanishi: 2008, 'Development of Varicella vaccine'. *J Infect Dis* **197**, S41–4.
- Tanguay, S. and J. J. Killian: 1994, 'Direct comparison of ELISPOT and ELISA-based assays for detection of individual cytokine-secreting cells'. *Lymphokine and cytokine research Lymphokine Cytokine Res* **13**, 259–63.
- Tassignon, J., W. Burny, S. Dahmani, L. Zhou, P. Stordeur, B. Byl, and D. D. Groote: 2005, 'Monitoring of cellular responses after vaccination against tetanus toxoid: comparison of the measurement of IFN-gamma production by ELISA, ELISPOT, flow cytometry and real-time PCR.'. *J Immunol Methods* **305**(2), 188–98.
- Terada, K., S. Kawano, Y. Yagi, Y. Shimada, and N. Kataoka: 1996, 'Alteration of T cells and natural killer cells during chickenpox in infancy.'. *J Clin Immunol* **16**, 55–9.
- Tillieux, S. L., W. S. Halsey, E. S. Thomas, J. J. Voycik, G. M. Sathe, and V. Vassilev: 2008, 'Complete DNA sequences of two oka strain varicella-zoster virus genomes'. *J Virol* **82**, 11023–44.
- Tsukahara, T., A. Yaguchi, and Y. Horiuchi: 1992, 'Significance of monocytosis in varicella and herpes zoster'. *J Dermatol* **19**, 94–8.
- Twomey, J. J., F. Gyorkey, and S. M. Norris: 1974, 'The monocyte disorder with herpes zoster'. *J Lab Clin Med* **83**, 768–77.
- Tyring, S., J. Stek, J. Smith, J. Xu, M. Pagnoni, I. Chan, J. Silber, J. Parrino, and M. Levin: 2012, 'Varicella-zoster virus-specific enzyme-linked immunospot assay responses and zoster-associated pain in herpes zoster subjects.'. *Clin Vaccine Immunol.* **19**(9), 1411–5.
- Utsuyama, M., K. Hirokawa, C. Kurashima, M. Fukayama, T. Inamatsu, K. Suzuki, W. Hashimoto, and K. Sato: 1992, 'Differential age-change in the numbers of CD4+CD45RA+ and CD4+CD29+ T cell subsets in human peripheral blood'. *Mech Ageing Dev* **63**(1), 57–68.

- Vaquerano, J. E., M. Peng, J. W. C. Chang, Y. M. Zhou, and S. P. L. Leong: 1998, 'Digital quantification of the enzyme-linked immunospot (ELISPOT)'. *Biotechniques* **25**, 830–836.
- Varisli, O., C. Uguz, C. Agca, and Y. Agca: 2009, 'Various physical stress factors on rat sperm motility, integrity of acrosome, and plasma membrane'. *J Androl* **30**, 75–86.
- Vassilopoulos, D., I. Rapti, M. Nikolaou, F. Hadziyannis, and S. J. Hadziyannis: 2008, 'Cellular immune responses in Hepatitis B virus e antigen negative chronic Hepatitis B'. *J Viral Hepat* **15**, 817–26.
- Vogtmann, A.: 2005, 'Vergleichende Untersuchungen zur automatisierten Auswertung von Elispot-Platten mit verschiedenen Bildanalysesystemen'. Ph.D. thesis, Klinik und Poliklinik fuer Dermatologie, Venerologie und Allergologie Universitaet Wuerzburg.
- Volpi, A. and L. Stanberry: 2007, 'Herpes zoster in immunocompromised patients'. *Herpes* **14**, 31.
- Wagenpfeil, S., A. Neiss, K. Banz, and P. Wutzler: 2004, 'Empirical data on the varicella situation in Germany for vaccination decisions'. *Clin Microbiol Infect* **10**, 425–430.
- Watson, B.: 2008, 'Humoral and cell-mediated immune response in children and adults after 1 and 2 doses of Varicella vaccine'. *J Infect Dis* **197**, S143–6.
- Weinberg, A., J. Zhang, M. Oxman, G. Johnson, A. Hayward, M. Caulfield, M. Irwin, J. Clair, J. Smith, H. Stanley, R. Marchese, R. Harbecke, H. Williams, I. Chan, R. Arbeit, A. Gershon, F. Schoedel, V. Morrison, C. Kauffman, S. Straus, K. Schmader, L. Davis, and M. Levin: 2009, 'Varicella-Zoster Virus-Specific Immune Responses to Herpes Zoster in Elderly Participants in a Trial of a Clinically Effective Zoster Vaccine'. *J Infect Dis* **200**, 1068–77.
- Weinberg, J. M.: 2007, 'Herpes zoster: epidemiology, natural history, and common complications'. *J Am Acad Dermatol* **57**, S130–5.
- Wheelock, E. F.: 1965, 'Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin'. *Science* **149**, 310–1.
- Wilcoxon, F.: 1945, 'Indiviudal comparison by ranking methods'. *Biometrics Bull* **1**, 80–83.
- Willeke, P., M. Gaubitz, H. Schotte, C. Maaser, W. Domschke, B. Schlueter, and H. Becker: 1997, 'Increased serum levels of macrophage migration inhibitory factor in patients with primary Sjögren's syndrome'. *Arthritis Res Ther* **9**, R43.
- Wood, M.: 2002, 'Understanding pain in Herpes Zoster: an essential for optimizing treatment'. *J Infect Dis* **186**, S78–82.
- Wood, M. J., R. Kay, R. H. Dworkin, S. J. Soong, and R. J. Whitley: 1996, 'Oral acyclovir therapy accelerates pain resolution in patients with herpes zoster: a meta-analysis of placebo-controlled trials'. *Clin Infect Dis* **22**, 341–7.

- Wood, S. M., S. S. Shah, A. P. Steenhoff, and R. M. Rutstein: 2008, 'Primary Varicella and Herpes Zoster among HIV-infected children from 1989 to 2006'. *Pediatrics* **121**, 150–6.
- Woolf, C. J. and R. J. Mannion: 1999, 'Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management'. *Lancet* **353**, 1959–64.
- Wutzler, P. and N. Meister: 1997, 'Herpes Zoster - Symptomatologie, demographische Daten und prognostische Faktoren'. *Deutsches Aerzteblatt* **94**, A1129–33.
- Wutzler, P. and A. Sauerbrei: 2009, *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie*, Chapt. Varicella-Zoster-Virus (VZV), pp. 746–752. Thieme, Stuttgart.
- Xing, Q., D. Hu, F. Shi, and F. Chen: 2013, 'Role of regulatory T cells in patients with acute herpes zoster and relationship to postherpetic neuralgia'. *Arch Dermatol Res* **305**, 715–722.
- Yamanishi, K.: 2008, 'Molecular analysis of the Oka vaccine strain of varicella-zoster virus'. *J Infect Dis* **197**, S45–8.
- Yang, J., V. M. Lemans, I. W. Flinn, C. Krone, and R. F. Ambinder: 2000, 'Application of the ELISPOT assay to the characterization of CD8+ responses to Epstein-Barr virus antigens'. *Blood* **95**, 241–248.
- Yu, H. R., R. F. Chen, K. C. Hong, C. N. Bong, W. I. Lee, H. C. Kuo, and K. D. Yang: 2005, 'IL-12-independent Th1 polarization in human mononuclear cells infected with varicella-zoster virus'. *Eur J Immunol* **35**, 3664–72.
- Zhang, M., N. Wu, L. Yang, J. Zhang, X. Sun, S. Zhong, X. Ma, and Y. Whang: 2011, 'Study on the T-helper cell 1 and 2 cytokine profile in blister fluid of patients with herpes zoster and its clinical significance'. *J Dermatol* **38**, 1158–1162.
- Zhang, W., R. Caspell, A. YKarulin, M. Ahmad, N. Haicheur, A. Abdelsalam, K. Johannesen, V. Vignard, P. Dudzik, K. Georgakopoulou, A. Mihaylova, K. Silina, N. Aptsiauri, V. Adams, P. V. Lehmann, and S. McArdle: 2009, 'ELISPOT assays provide reproducible results among different laboratories for T-cell immune monitoring-even in hands of ELISPOT-inexperienced investigators.'. *J Immunotoxicol* **6**, 227–234.
- Zola, H., B. Swart, I. Nicholson, and E. Voss (eds.): 2007, *Leukocyte and Stromal Cell Molecules: the CD Markers*. John Wiley and Sons Inc., New York.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Regina Antonia Ebert geb. Baukholt, dass ich diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die vorgelegte Dissertationsschrift wurde bisher bzw. gleichzeitig weder im Ausland, noch im Inland in gleicher oder ähnlicher Form in keiner anderen Universität vorgelegt. Alle Zitate oder Stellen, die dem Wortlaut nach anderen Werken entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall unter genauer Angabe der Quelle deutlich als Entlehnung kenntlich gemacht.

