

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. H. Wagner, Ph. D. (Melbourne))

Vergleich von ELISA, Immunfluoreszenz,  
Durchflußzytometrie, Westernblot und  
Agglutinationstest zum Nachweis von  
Serumantikörpern gegen *Francisella tularensis*

**Nele Kischel**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. H. Wagner, Ph. D. (Melbourne)

2. apl. Prof. Dr. Th. Chr. Miethke

Die Dissertation wurde am 23.05.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 13.11.2002 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Die Erkrankung Tularämie</b>	<b>5</b>
1.1.1 Allgemeines zu Tularämie	5
1.1.2 Ätiologie der Tularämie	6
1.1.3 Verbreitung des Erregers	7
1.1.4 Inzidenz der Tularämie in Deutschland	8
1.1.5 Reservoir/Übertragungswege	8
1.1.6 Pathogenese und Immunreaktion	9
1.1.7 Verlauf/Formen/Krankheitsbild	10
1.1.8 Differentialdiagnostik	13
1.1.9 Therapie	14
1.1.10 Prophylaxe	15
<b>1.2 Diagnostik der Tularämie</b>	<b>16</b>
<b>2. ZIELSTELLUNG</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Auswahl der Testseren</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Bakterien</b>	<b>22</b>
3.2.1 Stämme	22
3.2.2. Anzucht	22
3.2.3 KBE-Bestimmung	23
3.2.4 Antigen- Aufbereitung	23
3.2.5 Verwendete Lösungen	25
<b>3.3 Durchgeführte Tests</b>	<b>26</b>
3.3.1 Antikörper-ELISA	27
3.3.2 Durchflußzytometrie	30
3.3.3 Immunfluoreszenz	35
3.3.4 Westernblot	36
3.3.5 IMB-Agglutinationstest	39
3.3.6 DIFCO-Agglutinationstest	40
<b>3.4 Statistische Auswertung</b>	<b>42</b>
3.4.1 Antikörper-ELISA	42
3.4.2 Durchflußzytometrie	44
3.4.3 Immunfluoreszenz	44
3.4.4 Westernblot	45
3.4.5 IMB-Agglutinationstest	45
3.4.6 DIFCO-Agglutinationstest	45

<b>4. ERGEBNISSE DER SERODIAGNOSTIK</b>	<b>46</b>
4.1 ELISA	46
4.2 Durchflußzytometrie	48
4.3 Immunfluoreszenz	52
4.4 Westernblot	56
4.5 IMB-Agglutinationstest	57
4.6 DIFCO-Agglutinationstest	59
4.7 Methodenvergleich	61
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>64</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>69</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>72</b>
<b>8. DANKSAGUNG</b>	<b>76</b>

## Abkürzungen

<b>Ak</b>	Antikörper
<b>DFZ</b>	Durchflußzytometrie
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>EndKonz.</b>	Endkonzentration
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>F.t.</b>	<i>Francisella tularensis</i>
<b>IF</b>	Immunfluoreszenz
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>Ig-POD</b>	Peroxidase-markiertes Immunglobulin
<b>IMB</b>	Institut für Mikrobiologie der Sanitätsakademie der Bundeswehr
<b>KBE</b>	Koloniebildende Einheit
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid von <i>Francisella tularensis</i>
<b>LVS</b>	<i>Francisella tularensis</i> live vaccine strain
<b>MAk</b>	monoklonaler Antikörper
<b>MAk 11/1/6</b>	Monoklonaler Antikörper gegen <i>Francisella tularensis</i>
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>PBS</b>	Posphate-buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>TMB</b>	Tetramethylbenzidin
<b>TBS</b>	Tris-buffered saline

# **1. Einleitung**

## **1.1 Die Erkrankung Tularämie**

### **1.1.1 Allgemeines zur Tularämie**

Die Tularämie ist eine auf den Menschen übertragbare Zoonose und war früher auch unter Namen, wie Hasenpest, Deerfly fever, Ohara-Krankheit u.ä. bekannt. Wie schon die vielen Namen erkennen lassen, betrifft diese Erkrankung vor allem Menschen, die häufig mit Naturprodukten Umgang haben bzw. sich oft in der freien Natur bewegen, wie Jäger, Wald- und Forstarbeiter sowie Angestellte in der Nahrungsmittelindustrie.

Erstmals isoliert und beschrieben wurde der Erreger „*Bacterium tularense*“ 1911 von G.W. McCoy in Tulare Country, Kalifornien (Francis, E., S.3217, 1983).

Entscheidende Erkenntnisse über den Erreger, seine Übertragung und den Krankheitsverlauf sammelte um 1925 der Chirurg Dr. Edward Francis. Zu seinen Ehren wurde das Bakterium 1959 in „*Francisella tularensis*“ umbenannt (Jellison, W.L., S.2895, 1995).

*Francisella tularensis*, ein kleines, gramnegatives, fakultativ intrazelluläres Bakterium, ruft bei Erkrankten hohes Fieber und regionale Lymphknotenschwellungen sowie häufig Ulzera an der Haut und den Schleimhäuten hervor.

Die unspezifischen Symptome, welche in dieser Art bei vielen Infektionskrankheiten vorkommen, und die heutzutage geringe Inzidenz der Tularämie in Deutschland führen wahrscheinlich dazu, daß die Tularämie als mögliche Differentialdiagnose zu selten in Erwägung gezogen wird. Ist die Tularämie in Deutschland selten, so verdienen vor allem auch die Infektionsmöglichkeiten im Ausland Beachtung: kontaminiertes Trinkwasser, infizierte Insekten oder unzureichend gegartes Kaninchen- und Hasenfleisch. Ein importiertes Kaninchen – das Herkunftsland war nicht mehr zu ermitteln – war auch für zwei Tularämie-Fälle im Jahr 2000 in Deutschland verantwortlich (Epid. Bulletin 18/2000).

Für den klinischen Verlauf und die Therapie ist jedoch eine frühe Diagnosestellung von großer Bedeutung (Penn et al., S.267, 1987). Eine frühzeitig begonnene Antibiotikatherapie mit Streptomycin verläuft in der Regel erfolgreich, die Letalität liegt bei 1–2,5%. Unbehandelt beträgt die Letalität 4-35% bei *Francisella tularensis subsp. tularensis* (Penn, R., S.2065, 1995).

In Deutschland sind Erregernachweis, bestätigte Erkrankung und Tod durch Tularämie gemäß Infektionsschutzgesetz § 6, 8 und 9 meldepflichtig.

Die Inzidenz lag in den letzten Jahren bei 0–5 Fällen/Jahr. (Epid. Bulletin 18/2000).

### 1.1.2 Ätiologie der Tularämie

*Francisella tularensis* (Familie: *Pasteurellaceae*, Genus: *Francisella*) ist ein Gram-negatives, schlecht anfärbbares, unbewegliches und fakultativ intrazelluläres Bakterium. Der mit 0,2–0,7 µm sehr kleine, pleomorphe Erreger ist Katalase-positiv und wächst strikt aerob. Das Bakterium bildet keine Sporen, kann aber dennoch einige Monate bei kühlen und feuchten Bedingungen in Tierkadavern, im Boden und in Gewässern überleben. Auch im Aerosol-Zustand bleibt der Erreger mehrere Stunden infektiös. *Francisella tularensis* ist gegenüber Desinfektionsmitteln und Hitze sensitiv. Die Virulenz von *Francisella tularensis* hängt wahrscheinlich mit der Ausbildung einer Kapsel zusammen.

Innerhalb des Genus *Francisella* werden phänotypisch und genotypisch die beiden Species *Francisella tularensis* und *Francisella philomiragia* unterschieden. Die Species *Francisella tularensis* wird in folgende 4 Subspecies unterteilt:

*ssp. tularensis* (Biovar Typ A)

*ssp. holartica* (Biovar Typ B)

*ssp. mediaasiatica*

*ssp. novicida*

Biovar A weist die höchste Virulenz auf, klinisch von Bedeutung sind vor allem die ersten drei der genannten Subspecies. Infektionen mit *Francisella tularensis ssp. novicida* wurden bisher nur selten beobachtet, und wenn, dann vor allem bei immunsupprimierten Personen (Oslufjev et al., S.873, 1983).

Serologisch sind die Subspecies – mit Ausnahme von *ssp. novicida* – nicht zu unterscheiden, aufgrund ihrer biochemischen Aktivität ist es bedingt möglich (Hollis et al., S.1604, 1989).

Gegenwärtig werden jedoch verschiedene Ansätze, wie Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und andere molekularbiologische Methoden zur Identifizierung und Differenzierung des Genus *Francisella*, der Species und Subspecies entwickelt (Forsmann et al., S.42, 1994; 3rd Conference on Tularemia, 2000, Spain). Neue Ansätze lassen sich mit dem Abschluß der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *Francisella tularensis* erhoffen.

### 1.1.3 Verbreitung des Erregers

Die Tularämie tritt endemisch zwischen dem 30. und 71. nördlichen Breitengrad auf. Typ A, die virulenteste Subspecies, kommt vor allem in Nordamerika vor. Typ B, weniger virulent, tritt vor allem in Asien und Europa auf, aber ebenfalls auch in Nordamerika.

In Europa scheint sich seit den 70er Jahren jedoch auch Typ A zu finden, welcher vermutlich durch infizierte Nagetiere oder Zugvögel eingeschleppt wurde (Gurycova, S.799, 1998). An dieser Stelle sei aber auch erwähnt, daß *Francisella tularensis* während des kalten Krieges Gegenstand militärischer Forschung in Ost und West war und man vermutet in diesem Zusammenhang ein Freisetzen von *Francisella tularensis ssp. tularensis* aus entsprechenden Forschungseinrichtungen (Preston, S.58, 1998).

Während des 2. Weltkrieges ereigneten sich in Russland große Epidemien.

In Polen, Österreich, Schweden, Tschechien, der Slowakei, Italien und Spanien kam es in den letzten 30 Jahren immer wieder zu kleinen und größeren Endemien (bis zu 1000 Fälle), da dort Tularämie-Naturherde existieren. (Christenson, S.287, 1984; Greco et al., S.36, 1987; Kozuch et al., S.96, 1995; Hubalek et al., S.909, 1998). Ein weiteres Endemiegebiet ist Skandinavien.

Kleinere Endemien gab es in den ersten 60 Jahren des 20. Jahrhunderts auch in Deutschland (Jusatz, S.82, 1961; Knothe, S.907, 1959). Nach dem Krieg ging die Inzidenz der Tularämie vor allem durch verbesserte Hygiene, nachlassende Nagetierpopulationen und bessere Insektenschutzmittel rapide zurück.

Im letzten Jahr gab es wiederholt größere Endemien im vom Krieg gezeichneten ehemaligen Jugoslawien (Bosnien, Kroatien) sowie im Kosovo (8/99 bis 4/2000). Infektionsquelle waren kleine Nagetiere, die eine Kontamination von Trinkwasser und Nahrungsmitteln verursacht hatten (Epidemiolog. Bulletin 18/2000). In diesem Zusammenhang wurden im April 2000 bereits einige der weiter unten beschriebenen Test von Mitarbeitern der Sanitätsakademie München im Kosovo vor Ort erfolgreich zur Diagnostik eingesetzt.

## 1.1.4 Inzidenz der Tularämie in Deutschland

Zwei der letzten Tularämie-Infektionen in Deutschland ereigneten sich durch Verzehr infektiösen Hasenfleisches. Im Januar 2000 erkrankte ein Ehepaar, welches in einem Restaurant unzureichend gegartes Kaninchenfleisch verzehrt hatte. Die Herkunft des Tieres konnte von der Veterinärbehörde des Landes Nordrhein-Westfalen nicht mehr ermittelt werden (Epid. Bulletin 18/2000). Desweiteren erkrankten 2001 ein Vater und seine Tochter nachdem sie, einen zuvor mit dem Auto überfahrenen Hasen, ausgenommen und verspeist hatten (Artikel in Arbeit).

Traten in Deutschland von 1950 bis 1989 noch 635 Tularämiefälle auf, davon alleine über 300 zwischen 1950 und 1953, so wurden von 1990 bis 1998 nur 17 Fälle am Robert-Koch-Institut gemeldet (Pöhn et al., S.165, bga-Schrift 5/93). Im Jahre 1999 waren es zwei Fälle und im Jahre 2000 kam es bisher zu den zwei oben erwähnten Tularämie-Infektionen.

Diese niedrige jährliche Inzidenz von 0–5 Erkrankungsfällen hat vermutlich nicht wenig dazu beigetragen, dass die Tularämie als mögliche Diagnose bzw. Differentialdiagnose wahrscheinlich viel zu selten erwogen wird.

## 1.1.5 Reservoir / Übertragungswege

Natürliche Wirte für *Francisella tularensis* stellen Hasen, Wildkaninchen, Biber, Feldmäuse, große Wühlmäuse und Hamster, sowie einige blutsaugende Insekten, wie Zecken, Läuse, Flöhe, Mücken und Stechfliegen dar. Über 100 Säugetiere und mehr als 50 Arthropoden stellen potentielle Vektoren dar (Penn, S.2062, 1995).

Vereinzelt wurde der Erreger auch aus Haustieren, wie Hund und Katze, isoliert (Liles et al., S.621, 1993). Es besteht ein Übertragungskreislauf zwischen den Säugetieren und Arthropoden, der manchmal auch den Menschen einbezieht. Die Übertragung auf den Menschen kann via Insektenstich, durch direkten Kontakt mit einem infizierten Tier, aerogen,



über kontaminiertes Wasser oder infiziertes, unzureichend gegartes Fleisch erfolgen. Zu berücksichtigen ist auch die potentielle Gefährdung von Laborpersonal, das mit *Francisella tularensis* arbeitet (Burke, S.56, 1977). Eine Übertragung Mensch-Mensch ist jedoch unwahrscheinlich, wie 1959/60 eine Epidemie in einer Zuckerfabrik in Niederösterreich zeigte, bei der 500 von 700 Arbeitern erkrankten, jedoch keine Familienangehörigen oder andere Kontaktpersonen (Flamm et al., 1960). Daß *Francisella tularensis* hoch infektiös ist, zeigt sich an der niedrigen Erregermenge, die ausreicht, um eine Infektion hervorzurufen. Bei Hautkontakt – vermutlich bedarf es nicht einmal Mikroläsionen oder Wunden – oder Inhalation sind 10–50 Keime ausreichend, bei oraler Aufnahme beträgt die Infektionsdosis ca.  $10^2$ – $10^8$  Keime (Dedić et al., S.370, 1993).

Besonders gefährdet sind prinzipiell Jäger und Angestellte in der Land- und Forstwirtschaft sowie in Landwirtschaftsprodukte verarbeitenden Betrieben.

### 1.1.6 Pathogenese und Immunreaktion

*Francisella tularensis* ist unterschiedlich virulent, v.a. die *ssp. tularensis* ruft schwere Verläufe hervor. Die Ursache der unterschiedlichen Virulenz ist bisher nicht bekannt.

Der fakultativ intrazelluläre Erreger *Francisella tularensis* vermehrt sich zunächst im Bereich der Eintrittsstelle in folgenden Zellen:

- Zellen des retikulo-endothelialen Systems
- Makrophagen
- T- und B-Lymphozyten (Grunow et al., S.88, 2000)

Untersuchungen an Knock-out-Mäusen ergaben, dass die Reaktion auf eine Infektion mit *Francisella tularensis* in den ersten drei Tagen noch T-Zell-unabhängig erfolgt (Culkin et al., S.3281, 1997).

Die Rolle der B-Lymphozyten bei der frühen Abwehr ist Ak-unabhängig und weiter noch nicht aufgeklärt.

Makrophagen werden durch die Freisetzung von  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  zusätzlich stimuliert.

Die eigentliche Abwehr gegen *Francisella tularensis* übernimmt nun die T-zellabhängige Immunantwort. (Elkins et al., S.4574, 1992 ; Tärnvik et al., S.351, 1992)

Es kommt zur Induktion von CD4-positiven TH<sub>1</sub> –Helferzellen, welche über die zusätzliche Produktion von IFN $\gamma$  die unspezifische Abwehr und die Bildung spezifischer Antikörper gegen das LPS von *Francisella tularensis* in den B-Lymphozyten weiter stimulieren und zytotoxische T-Lymphozyten aktivieren, wie im Mausmodell gezeigt werden konnte. Offenbar kommt es durch Phospholipide von *Francisella tularensis* zu einer starken Aktivierung von  $\gamma\delta$ T-Zellen, die auch in vitro nach Stimulation von Blutlymphozyten nachgewiesen werden kann (Karttunen et al., S.755, 1991).

Bisher noch nicht eindeutig geklärt ist :

- ob der Befall der T- und B-Lymphozyten zu einer Modulation der Immunantwort führt
- der Mechanismus der intrazellulären Persistenz
- der Effektormechanismus, der zur Bewältigung der Infektion führt
- die Rolle des LPS sowie der Ak und zytotoxischen, CD8-positiven T-Lymphozyten für die Infektabwehr
- die Rolle der  $\gamma\delta$ T-Zellen

Neben protektiven Effekten können Antikörper die Erregeraufnahme in Fc-rezeptorpositive Zellen verstärken und somit zum intrazellulären Überleben von *Francisella tularensis* beitragen.

### **1.1.7 Verlauf / Formen / Krankheitsbild**

Der klinische Verlauf einer Infektion mit *Francisella tularensis* ist abhängig von der Virulenz des Bakteriums, der Eintrittspforte und dem Immunstatus des Betroffenen. Das Spektrum der klinischen Manifestation ist sehr breit. Der Infekt kann sich nahezu asymptomatisch darstellen, aber auch im Rahmen einer akuten Sepsis rasch zum Tode führen. Bei schweren Verläufen (vor allem bei der Infektion mit der *ssp. tularensis*) kann es im Rahmen einer hämatogenen Erregeraussaat zum Befall v.a. der inneren Organe, wie Milz, Leber, Lymphknoten, Knochenmark, Myokard und Lunge kommen. Ausgedehnte Nekrosen können

zum Funktionsverlust der betroffenen Organe und somit zum Tode führen. (Hoel et al., S.349, 1991).

Nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 3–5 Tagen (Minimum 1 Tag, Maximum 21 Tage) beginnt die Erkrankung plötzlich mit uncharakteristischen Allgemeinsymptomen, wie Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen sowie Abgeschlagenheit. Hinzu zu diesen grippeähnlichen Symptomen können Husten, Myalgien, Übelkeit und Erbrechen, Leibschmerzen, Nachtschweiß, Nackensteife, Dysurie und Diarrhoe kommen, z.T. über Monate einhergehend, mit Gewichtsverlust und Schwäche. Fast alle Patienten haben Fieber und grippeähnliche Symptome, ansonsten sind die Symptome meist, unabhängig von der Form der Tularämie, an der jemand erkrankt, sehr variabel.

#### Klinisch unterscheidet man folgende Verlaufsformen:

Die **äußere Form** der Tularämie (80%), bei der der Erreger via Insektenstich oder Hautläsion über direkten Kontakt mit der Infektionsquelle eindringt, und die **innere Form** (20%) (= typhöse Form), welche zumeist nach aerogener oder alimentärer Exposition auftritt.

#### **Äußere Form:**

Nach 3–5 Tagen entsteht bei ca. 60% der Patienten an der Eintrittsstelle der Primäraffekt, ein kutanes Ulcus. Fast immer tritt gleichzeitig eine Lymphangitis und Lymphadenitis mit Schwellung und Abszedierung regionaler Lymphknoten auf (85% der Patienten). Vergrößerte Lymphknoten können aber auch das alleinige Merkmal der Erkrankung bleiben. Sie sind in der Regel weich, meist nicht oder nur wenig druckempfindlich, zeitweise jedoch auch schmerzhaft. Der mittlere Durchmesser ist ca. 2 cm (Minimum 0,5 cm, Maximum 10 cm!).

Die ulzero-glanduläre Form der Tularämie manifestiert sich vor allem an den ungeschützten Partien der Extremitäten sowie des Kopf- und Halsbereiches.

Tritt der Erreger über die Konjunktiven ein, entsteht das Bild der okulo-glandulären Tularämie oder Parinaudschen Konjunktivitis.

#### **Innere Form:**

Nach Ingestion von Francisella kann es zu Entzündungen der Rachenschleimhaut (oropharyngeale Form), zu Milzschwellungen oder zu Durchfall mit starken Leibschmerzen (abdominale Form) kommen.

Die Inhalation des Erregers kann zur Entstehung einer Pneumonie und Pleuritis führen (pulmonale Form). Die pulmonale Form tritt bei 50–94 % der an Tularämie Erkrankten auf und ist häufig mit anderen Formen kombiniert.

Klinisch imponieren die Formen, wie in der Tabelle aufgeführt.

**Tab.1: Klinische Manifestationen der Tularämie:**

<u>Form:</u>	<u>Symptome:</u>
<u>oropharyngeal:</u>	Infiltrate, Beläge, Ulcus in der Mundhöhle, Pharynx, Tonsillen Submandibuläre Lymphknoten-schwellung
<u>abdominal:</u>	Erbrechen, Diarrhoe, Obstipation, Darmblutungen, ileusartige Symptome, Schwellung mesenterialer Lymphknoten
<u>pulmonal:</u>	Unproduktiver Husten, oft einseitige Bronchopneumonie (Sputumdiagnostik nicht hilfreich!) Röntgen variabel: keine radiologischen Zeichen bis homogene Infiltrate, hiläre Lymphknotenvergrößerung, parenchymale Infiltrate, Pleuraerguß.
<u>glandulär:</u>	Nur Lymphknotenschwellung
<u>typhös:</u>	Generalisierter Befall aller Organe, v.a. bei Immundefizienz
<u>ulcero-kutan:</u>	Ulcera, v.a. an den Händen und Armen
<u>okulär:</u>	Parinaudsche Konjunktivitis

Folgende Symptome können in seltenen Fällen den Verlauf komplizieren und die Diagnosefindung für den Kliniker zusätzlich erschweren:

- Meningitis
- Enzephalitis

- Perikarditis
- Peritonitis
- angina-pectoris ähnliche Schmerzen mit EKG-Veränderungen
- Milzruptur
- Thrombophlebitis
- Osteomyelitis

Bei schlechter Abwehrlage oder sekundär nach hämatogener Erregeraussaat aus nekrotisierenden, einschmelzenden Lymphknoten, kann es zu einer Generalisierung kommen. Unter intermittierenden Fieberschüben kann es zum septischen Schock kommen. *Francisella tularensis* Typ A hat in diesen Fällen eine Letalitätsrate von ca. 30%.

### 1.1.8 Differentialdiagnostik

Die Tularämie muß von einer Reihe ähnlicher Krankheitsbilder abgegrenzt werden:

#### Lymphadenitiden bei

- Brucellose
- Streptokokken-/Staphylokokken-Infekt
- Beulenpest
- Katzenkratzkrankheit
- Sporotrichose
- Pasteurella multocida-Infektion

#### Septikämische Form

#### Intestinale Form

- Typhus
- Pseudo-TBC
- Aktinomykose
- Lymphogranulomatose
- Mononukleose

#### Lungen-Granulome

- TBC

### Pulmonale Form

- abszedierende Pneumonie
- Lungenpest
- Mykoplasmen-Pneumonie
- Melioidose
- Lungenmykose

Umgekehrt sollte die Tularämie aber auch bei den oben aufgeführten Krankheiten als mögliche Differentialdiagnose unbedingt berücksichtigt werden, vor allem wenn eine „verdächtige Anamnese“ vorliegt (Jäger, Urlaub in Osteuropa oder anderen Endemiegebieten u.ä.).

## **1.1.9 Therapie**

Wie schon erwähnt, ist für den Verlauf der Tularämie der möglichst frühzeitige Beginn einer Antibiotikatherapie mit Streptomycin, Gentamicin, Ciprofloxacin o.a. sehr entscheidend. Die Prognose ist im allgemeinen günstig, aber Patienten ohne wirksame Therapie können über Monate durch ein schweres Krankheitsgefühl beeinträchtigt sein. Je länger die Tularämie vor der Therapie besteht, desto langsamer spricht die Behandlung an und desto größer ist die Wahrscheinlichkeit von Komplikationen. Vor der Einführung des Streptomycin wurde der Verlauf folgendermaßen beschrieben: „31 Tage Fieber, 31 Tage im Bett und insgesamt circa 3½ Monate Arbeitsunfähigkeit“. (Evans et al., S.260, JAMA 1985)

Initial werden 30 mg/kg/d Streptomycin i.m. über 3 Tage gegeben, anschließend wird die Therapie für 7 – 14 d mit 15 mg/kg/d fortgeführt. Kommt es im Verlauf der ersten Behandlungstage zu einer Verstärkung der Symptome, mit Fieber und Schüttelfrost, ist am ehesten an eine Herxheimer-Reaktion zu denken, denn es findet sich in der Regel auch ein Antikörperabfall. Alternativ kann Gentamicin 3–5 mg/kg/d über 7–14 Tage gegeben werden. Neben den Aminoglycosiden sind Tetracycline (z.B. Doxycyclin 4 mg/kg/d für mind. 14 d) wirksam, dem Streptomycin sind sie aber hinsichtlich der Keimelimination unterlegen.

Chloramphenicol 50–100 mg/kg/d wird bei Verdacht auf begleitende Meningitis in Kombination mit Streptomycin gegeben. Penicilline sind in der Therapie der Tularämie unwirksam.

Ansonsten wird symptomatisch behandelt und abszedierende Lymphknoten chirurgisch versorgt. Eine Isolation Tularämieerkrankter ist nicht erforderlich, da die Übertragung von Mensch zu Mensch als unwahrscheinlich gilt.

Zur Verdeutlichung der Effizienz einer wirksamen Antibiotikatherapie siehe folgende Tabelle, welche die Letalität der Tularämie wiedergibt:

**Tab.2: Letalität der Tularämie:**

<b>Letalität</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>behandelt</b>
Äußere Form	4%	1–2,5%
Innere Form	35%	1–2,5%

### **1.1.10 Prophylaxe**

In Deutschland ist eine Vakzine gegen Tularämie nicht zugelassen. Somit bleibt dem Laborpersonal hierzulande nur der vorsichtige Umgang mit *Francisella tularensis*.

Aufgrund der geringen Inzidenz ist eine Impfung generell auch nicht unbedingt erforderlich. Durch das Meiden unzureichend gegarten Wildfleisches und kontaminierten Trinkwassers ist eine Infektion in Deutschland sehr unwahrscheinlich. Ebenso findet sich in Deutschland keine plötzliche, explosive Vermehrung von Nagetierpopulationen, wie jährlich in Schweden, ebenso keine Insektenplagen, dank Schädlingsbekämpfungsmaßnahmen. Dennoch ist die Aufklärung von exponierten Personen, z.B. Jägern, und in Endemiegebieten lebenden Menschen wichtig. Außerdem können Lebensmittelimporte ein gewisse Infektionsgefahr bergen.

*Francisella tularensis* war vor allem in Russland als biologischer Kampfstoff in Erprobung. Die großen Tularämie-Epidemien während und nach dem 2. Weltkrieg in Russland führten dort in den 40er Jahren zur Entwicklung attenuierter Lebendimpfstoffe zur intradermalen Injektion. Im Rahmen von Impfprogrammen wurde der als Gaisky Strain 15 bekannte Impfstoff bei Millionen von Russen angewandt (Tigertt, S.363, 1962).

Aus diesem Stamm wurde in den USA der Lebendvakzinstamm (LVS) von *Francisella tularensis* entwickelt (Stenmark et al., S.1792, 1999). Heute findet LVS vor allem bei gefährdetem Laborpersonal Anwendung; eine Verwendung für Zivilisten in Endemiegebieten ist jedoch auch denkbar und erfolgt auch heute noch in Rußland.

## 1.2 Diagnostik der Tularämie

Klinik und allgemeine Laborparameter reichen für eine eindeutige Diagnosestellung nicht aus, da die Symptome und Blutbildveränderungen relativ unspezifisch sind, d.h. bei vielen Infektionen vorkommen:

CRP	erhöht (Koskela et al, S.975, 1985)
LDH	leicht erhöht (Evans et al., S. 259, 1985)
Alk. Phosphatase	leicht erhöht (Evans et al., S. 259, 1985)
Leukozytose	5–20 x 10 <sup>9</sup> /l (Gelfand et al., S.417, 1989)

Der Liquorstatus ist meist unauffällig, z.T. kann eine Rhabdomyolyse zum Anstieg der Serumkreatinkinase und zu einer Myoglobulinurie führen. Eine Pyurie wird oft fälschlich als Harnwegsinfekt verkannt (Kaiser et al., S.242, 1985).

Die Diagnose Tularämie kann sicher nur durch direkten Erregernachweis aus Blut, Stuhl, Urin, Sputum, Eiter oder einem Ulcusabstrich bzw. durch Nachweis der spezifischen Antikörper im Patientenserum gestellt werden. Der Antikörpernachweis ist jedoch erst ab zwei Wochen post infectionem sicher möglich.



In den meisten Verdachtsfällen erfolgt bzw. erfolgte die Diagnose mittels Nachweis von Serumantikörpern gegen *Francisella tularensis* im Agglutinationstest. Dieser hat den Nachteil, dass frühestens nach 2 Wochen eindeutig hohe Titer von mehr als 1:160 zu finden sind (Koskela et al., S.976, 1985) und des weiteren gibt es Kreuzreaktivitäten mit verwandten Genera, wie z.B. *Brucella* und *Yersinia*. Sensitivere Tests waren nötig.

Neben dem Antikörpernachweis aus Seren kann der Erregernachweis aus Blut, Ulcusabstrich, Pleurpunktat, Magensaft und Sputum bei oralem Infektionsweg, Stuhl, Urin, Gewebeproben und Umweltproben versucht werden.

### **Kultur:**

Zu den klassischen diagnostischen Mitteln zählt die Kultivierung von *Francisella tularensis*.

Der direkte Erregernachweis ist aus Menschen-, Tier- und Umweltproben möglich, doch die Begleitmikroflora kann das Erregerwachstum schnell unterdrücken und so zu falsch negativen Resultaten führen.

Bei Abstrichen aus Ulcera sind 10 von 40 (25%) serologisch nachgewiesenen Tularämiefällen in der Kultur positiv gewesen (Sjöstedt et al., S.1047, 1997). Andere Studien ermittelten 47,8% (Junhui et al., S.480, 1996).

Beim Erregernachweis aus Blut war ein Wachstum nur bei 13,2% positiver Blutproben zu beobachten (Long et al., S.152, 1993).

Ein deutlicher Nachteil dieser Methode ist die erhöhte Gefahr von Infektionen des Laborpersonals durch *Francisella tularensis*, welches eine hohe aerogene Infektiosität besitzt.

Der Antigennachweis mittels **Erregerkultivierung** ist heutzutage „**kein Routineverfahren mehr** (und muß, wenn sie durchgeführt wird, unter erhöhten Sicherheitsbedingungen – L3 – erfolgen)“ (Epidemiologische Bulletin des Robert-Koch-Instituts, 18/2000). An Sensitivität ist diese Methode anderen, wie z.B. der PCR zudem deutlich unterlegen (47,8% gegenüber 82,6% Sensitivität in der PCR) (Junhui et al., S.481, 1996).

### **PCR:**

Mit der PCR ist ein DNA-Nachweis aus Blut, Gewebeproben, Stuhl, Ulcera und Umweltproben möglich.

Während eines Tularämieausbruchs in Schweden wurde mittels PCR der direkte Erregernachweis aus Ulcera infizierter Menschen durchgeführt. Das 16S rRNA Gen und ein 17-kDa Lipoprotein Gen wurden in extrahierten DNA nachgewiesen. Es wurden 29 von 40 serologisch gesicherten Fällen (73%) als positiv erkannt (Sjöstedt et al., S.1046, 1997).

Eine chinesische Arbeitsgruppe (Junhui et al., S.482, 1996) infizierte Mäuse mit unterschiedlichen Mengen *Francisella tularensis* und führte 15 min, 24 und 48 Stunden post infectionem den Antigennachweis mittels PCR aus Blut und Leber- und Milzgewebe durch. Je höher die Infektionsdosis war, desto früher war der Antigen-Nachweis hier möglich. Vor allem niedrige Erregermengen führten zu falsch negativen Ergebnissen. Die Sensitivität lag zwischen 69,9% (Blut) und 4,8% (Leber) bzw. 8,6% (Milz).

Ein Nachweis aus Vollblut von infizierten Mäusen und in vitro infizierten humanem Vollblut gelang mit einem Membranprotein (TUL4) als Primer (Long et al., S.154, 1993). Im Tierversuch war so eine Sensitivität von 82,6% erreicht worden (Junhui et al., S.479, 1996).

Weiter verwandte Primerpaare waren FNA8L und FNB2L und FNA7L und FNB1L. Hierbei lagen die Nachweisgrenzen bei 100 KBE/ml. Aus Milzproben konnte bei Mäusen in acht von neuen Fällen ein positives Ergebnis bestätigt werden (Fulop et al., S.346, 1996).

Grunow et al konnte mit der **TUL4-spezifischen PCR** *Francisella tularensis* ab einer Konzentration von  $10^2$  Bakterien/ml (PBS) bzw.  $10^3$  bis  $10^4$  Bakterien/ml (Serum) nachweisen. Der Arbeitsgruppe gelang in europäischen Hasen (*Lepus europaeus*) der Antigennachweis ab einer Antigenmenge von  $10^3$  Bakterien/ml in PBS und  $10^4$  Bakterien/ml in Humanserum mittels **capture-ELISA**. Im Vergleich lag die Nachweisgrenze beim **immuno-chromatographischen Assay** bei  $10^6$  bis  $10^7$  Bakterien/ml. Ebenso aus Urin, Sputum und Stuhl war ein Antigen-Nachweis möglich. (Grunow et al., S.87, 2000)

Der Antigennachweis spielt seine größte Rolle sicherlich bei der Herdsuche und Verbreitungskontrolle anhand von Umwelt- und Tierproben. Die Kontamination dieser Proben mit anderen Mikroorganismen kann die Diagnostik z.T. erheblich erschweren. Sensitivität und Spezifität der oben erwähnten Tests sind z.T. noch immer sehr niedrig. Ein ausreichend sicheres Screening von Patienten mit Verdacht auf eine *Francisella tularensis*-Infektion mittels Antigen-Nachweis ist deshalb nicht gegeben. Aus diesem Grund spielt der

Antigen-Nachweis derzeit in der Akutdiagnostik beim Menschen eine untergeordnete Rolle, hier ist der rasche, eindeutige Antikörpernachweis aus Patientenproben das probate Diagnostikum.

### **Agglutination:**

Der Agglutinationstest ist eine seit langem angewandte Methode zum Antikörpernachweis. Auf Grund von immer wieder auftretenden Problemen kam es zu einer Vielzahl von variierenden Ansätzen.

Neben der Röhrchenreihenagglutination wurde bereits 1960 die Objektträger-Schnellreaktion sowohl mit Vollblut als auch Serum beschrieben. Blockierende inkomplette Antikörper führten zu Prozonen. Es war die Zugabe der zehnfachen Antigenmengen nötig um diese Reaktion zu verhindern (Flamm et al., 1960).

Mit der Mikroagglutination wurde nach 4 Tagen 1 von 4 Positivseren erkannt, am 5.Tag 3 von 6 und nach 7 Tagen alle Proben. Die in diesem Verfahren bestimmten Titer wurden mit den im Röhrchenagglutinationstest bestimmten Titern verglichen. In der Mikroagglutination wurden 8-64fach höhere Titer gemessen als im Röhrchenagglutinationstest (Sato et al., S.2373, 1990). Die meisten Patienten wiesen Titer zwischen 1:80 und 1:640 auf. Von 44 Fällen konnten in der Mikroagglutination 40 als positiv nachgewiesen werden (Bevanger et al., S.435, 1988).

### **Immunfluoreszenz:**

Auch die Immunfluoreszenz zählt zu den älteren Nachweisverfahren. Als Material eignet sich hierfür neben Blut auch Gewebe (Hofer et al., S.301, 1997).

### **ELISA:**

Mit dem ELISA ist ein Antigen- und Antikörpernachweis möglich.

In Wasserproben gelang ein Antigennachweis mittels Duct ELISA ab  $10^4$  Bakterien/ml und lag somit um mehr als das Zehnfache unter der Nachweisgrenze des in der Mikrotiterplatte durchgeführten ELISA (Sandström et al., S.316, 1986).

Beim Antikörpernachweis können mono- oder polyvalente spezifische Antikörper verwendet werden. Separate Testung von Seren auf IgG, IgM und IgA lieferte eine Sensitivität von 97,5% , eine Testung aller drei Immunglobuline gemeinsam 93% (Bevanger et al., S.434, 1988).

Im eigenen Institut wurde z.B. ein hochsensitiver Capture-ELISA (Grunow et al., S.86, 2000; Berdal et al., 2000) entwickelt.

### **Westernblot:**

Der Nachweis von *Francisella tularensis*-Antikörpern mittels Westernblot wird ausführlicher im Kapitel 3.3.4 beschrieben.

Ganz aktuell ist die **Durchflußzytometrie** – in der Zelltypisierung Routine – zum direkten Antikörpernachweis verwendet worden. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in Kapitel 3.3.2 .

Weitere Tests zum Nachweis von *Francisella tularensis* sind :

- Stimulation von T-Lymphozyten mit *Francisella tularensis*-Antigenen in vitro und in vivo. Die Entwicklung einer zellulären Immunität ist über viele Jahrzehnte nachweisbar. In Deutschland ist der **Tularin-Hauttest** nicht zugelassen (Evans et al., S.252, 1985).
- ein **immunochemographischer Schnelltest** zum Nachweis des LPS von *Francisella tularensis* (Grunow et al., S.87, 2000)

In Deutschland beschäftigt sich das Institut für Mikrobiologie der Sanitätsakademie München seit einigen Jahren schwerpunktmäßig mit der Diagnostik der Tularämie und wurde 1999 durch das Robert-Koch-Institut zum Konsiliarlabor für Tularämie ernannt.

Dort wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit unter Betreuung von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Grunow verschiedene serologische Tests zum Teil etabliert, zum Teil optimiert und durchgeführt. Anschließend erfolgte ein Vergleich der durchgeführten Tests mit statistischer Auswertung.

## **2. Zielstellung**

Es ist wahrscheinlich, daß die Tularämie wegen ihrer niedrigen Inzidenz in Deutschland zu selten als mögliche Diagnose bzw. Differentialdiagnose in Betracht gezogen wird, oder zumindest häufig erst nach längerem Krankheitsverlauf. Doch kann gerade der frühzeitige Beginn einer Antibiose viele Komplikationen vermeiden. Aus eben diesem Grund ist eine sensitive Diagnostik von großer Bedeutung.

An serologischen Tests zur Tularämie-Diagnostik ist in Deutschland vom Paul-Ehrlich-Institut seit 1963 nur der Agglutinationstest der Firma DIFCO zum Nachweis von Serum-Antikörpern zugelassen (Bacto Francisella-tularensis-Antigen für die Objektträger- und die Röhrenagglutination).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zusätzlich zu dem oben erwähnten Test folgende serodiagnostische Testverfahren mit je 50 positiven und negativen – z.T. in bis zu 10 verschiedenen Verdünnungen pro Serum – durchgeführt:

- ELISA
- Westernblot
- Immunfluoreszenz
- Durchflußzytometrie
- IMB-Agglutinationstest
- DIFCO- Agglutinationstest

Hierbei galt es den Testaufbau zu optimieren und die verschiedenen Verfahren auf ihre Vor- und Nachteile hin zu evaluieren. Es erfolgte eine statistische Auswertung aller Testergebnisse. Hierbei wurde eine hohe Sensitivität und Spezifität in den Vordergrund gestellt

Ziel dieser Arbeit war die Ermittlung von praktischen und möglichst spezifischen und sensitiven Tests, die sowohl im Labor als auch im Feldeinsatz eine optimale Serodiagnostik der Tularämie erlauben.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Auswahl der Testseren**

Das IMB verfügt über eine relative große Sammlung Tularämie-positiver Seren, die aus schwedischen und anderen Endemiegebieten stammen. Die für die Testevaluation verwandten Positivseren wurden bereits in einem schwedischen Labor vorgetestet und stammen alle von Tularämiepatienten aus einem Krankheitsausbruch. Alle Patienten wiesen einen symptomatischen Verlauf auf. Bei allen fand eine Serokonversion statt. Aus diesem Patientenkollektiv wurden 50 Aliquots zufällig ausgewählt.

Für die 50 Negativseren wurden anonymisierte Restaliquots von gesunden Blutspendern bezogen. Die Auswahl erfolgte zufällig.

Die 100 ausgewählten Seren wurden einmal aufgetaut, für die folgende Testdurchführung entsprechend aliquotiert und wieder bei  $-29^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **3.2 Bakterien**

#### **3.2.1 Stämme**

Wie in der Einführung bereits beschrieben, hat *Francisella tularensis* 4 Subspecies, welche – mit Ausnahme von ssp. novicida – serologisch nicht zu unterscheiden sind.

Von uns wurde als Antigen nur *Francisella tularensis* ssp. *holartica* verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Lebendvakzinstamm (LVS, ATCC Nr.29684).

#### **3.2.2 Anzucht**

Die Anzucht erfolgte auf im Zentralinstitut der Bundeswehr, München, selbst gegossenem Herz-Cystein-Agar, welcher mit 10% Schafsblut substituiert wurde. Nach ca. 2 Tagen aerober Bebrütung bei  $37^{\circ}\text{C}$  in feuchter Atmosphäre und 5%  $\text{CO}_2$  zeigten sich 1–2 mm große, runde, feuchte, bläulich-weiße Kolonien.

### 3.2.3 KBE-Bestimmung

Es wurden einige Ösen Bakterien in NaCl eingeschwemmt und die Bakteriensuspension auf  $OD_{560nm} = 1,0$  eingestellt und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Nachdem die optische Dichte aller Proben photometrisch bestimmt war, wurden 100  $\mu$ l jeder Verdünnung auf je 2 Platten ausgestrichen und 3 Tage bebrütet. Anschließend wurde die Zahl der koloniebildenden Einheiten erfasst. Als Sterilitätstest wurde hochkonzentrierte Suspension auf Platten ausgestrichen und nach 2-4 Tagen auf Wachstum überprüft. Dieses blieb jedoch aus.

Für die unverdünnten Proben ergab sich eine durchschnittliche Anzahl von  $2 \times 10^9$  KBE/ml.

### 3.2.4 Antigen-Aufbereitung

*Hierzu verwendete Materialien:*

- Francisella tularensis subsp. holartica
- 0.9% NaCl-Lösung
- 37%ige Formalinlösung
- PBS-Lösung
- Proteinase K
- Paraformaldehyd
- Natriumacid

Um möglichst exakte Ergebnisse bei der Testung der Seren zu erhalten, wurde das Antigen zu Beginn der Arbeit gleich für alle Tests hergestellt und im späteren Verlauf ausschließlich diese Antigen-Charge verwendet.

**Für den Western?blot und den IMB-Agglutinationstest** wurden einige Ösen des Lebend-Vakzin-Stammes *Francisella tularensis* in 0,9% NaCl-Lösung eingeschwemmt und durch Zugabe von Formalinlösung (1%ige Endkonzentration, für 30 Minuten) inaktiviert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension zwei mal je 60 Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und in PBS-Lösung resuspendiert. Photometrisch wurde die Suspension auf  $OD_{560nm}=2,5$  eingestellt. Die Aliquots für den Westernblot wurden bei  $-29^{\circ}C$  aufbewahrt. Für den IMB-Agglutinationstest wurde der Antigensuspension 0,05% Thiomersal zugesetzt, die Aufbewahrung erfolgte bei  $4^{\circ}C$  im Kühlschrank.

**Für die Durchflußzytometrie und den Antikörper-ELISA** wurden das LPS der Bakterien aufgereinigt und eine Bakteriensuspension hergestellt. Hierzu wurden die Bakterien in NaCl suspendiert ( $OD_{560nm}=1,0$ ) und 1:2 in Extraktionspuffer (Abbott, Deutschland) verdünnt. Nach 30 Minuten im Wasserbad bei  $100^{\circ}C$  wurde der abgekühlte Ansatz 15 Minuten bei 10.000 U/min zentrifugiert. In Extraktionspuffer gelöste Proteinase K (3,3 mg/ml) wurde im Verhältnis 1:2 zu der LPS-Suspension zugegeben. Anschließend wurde das LPS für 2 Stunden bei  $60^{\circ}C$  und darauf für weitere 25 Minuten bei  $100^{\circ}C$  im Wasserbad stengelassen. Dialysiert wurde über Nacht in PBS-Puffer. Die Aliquots wurden bei  $-29^{\circ}C$  tiefgefroren.

**Für die Immunfluoreszenz** wurden einige Ösen *Francisella tularensis* in PBS resuspendiert und für 2 Stunden Paraformaldehyd 1% ig der Suspension zugegeben. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 3500 U/min wurde der Überstand verworfen, die Bakterien in PBS resuspendiert und auf eine  $OD_{560nm}$  von 1,0 eingestellt. Abschließend wurde noch 0,02%ig Natriumazid zugegeben. Die Bakteriensuspension wurde bei  $4^{\circ}C$  im Kühlschrank aufbewahrt.

Ausnahme: **Für den DIFCO-Agglutinationstest** wurden die käuflichen Antigensuspensionen für die Objektträger- und Röhrchenagglutination entsprechend der Packungsbeilage und in variierten Ansätzen verwandt.



### 3.2.5 Verwendete Lösungen; Herstellung der Puffer

#### Bakterienaufbereitung:

- **PBS:** 2,15 g Kaliumdihydrogenphosphat + 5,96 g Dinatriumhydrogenphosphat + 33,95 g Natriumchlorid + 5 Liter Wasser

#### ELISA:

- **Waschpuffer PBS/Tween 0,05% :** PBS-Lösung + 0,05% Tween
- **Coating-Puffer:** 0,8 g Natriumcarbonat in 250 ml Milliporewasser solange zu 2,92 g Natriumhydrogencarbonat in 500 ml deionisiertes Wasser hinzugeben, bis ein pH von 9,0 erreicht ist
- **Verdünnungspuffer:** Waschpuffer + 10% Ziegen Serum

#### Durchflußzytometrie:

- **MAk 11/1/6 :** *Institut für Mikrobiologie der Sanitätsakademie der Bundeswehr, München, Germany*
- **FACS-Puffer:** PBS + 2% FKS (fetales Kälberserum) + 0,05% Natriumacid (wegen im FKS ev. vorhandener Hefen steril filtriert)

#### Westernblot:

- **Sample-Puffer :** *Invitrogen, Breda, Niederlande*
- **Tris-Glycin-Puffer:** 100 ml Tris-Glycin-Puffer 10x (*Invitrogen, Breda, Niederlande*) + 900 ml Aqua dest
- **Blotting-Puffer :** 40 ml Transfer-Puffer (*Invitrogen, Breda, Niederlande*) + 960 ml Aqua dest
- **TBS-Puffer :** 10 ml einer 1M Tris-Lösung (pH=8,0) + 8,77 g Natriumchlorid
- **Waschpuffer :** 50 ml TBS + 450 ml Aqua dest + 5 g Magermilchpulver

### 3.3 Durchgeführte Tests

Die ausgewählten Seren wurden in 5 verschiedenen Tests untersucht.

An *objektiven Methoden* wurden verwendet:

- Der Antikörper-ELISA Francisella tularensis
- Die Durchflußzytometrie

An *subjektiven Methoden* wurden verwendet:

- Die Immunfluoreszenz
- Der Westernblot
- Und die Agglutination, sowohl mit dem käuflichen Ag der Firma DIFCO, als auch mit eigenem Ag

Die Pufferzusammensetzung wurde im Folgenden nicht mehr einzeln aufgeführt, Angaben zur Herstellung sind in Kapitel 3.2.5 zu finden.

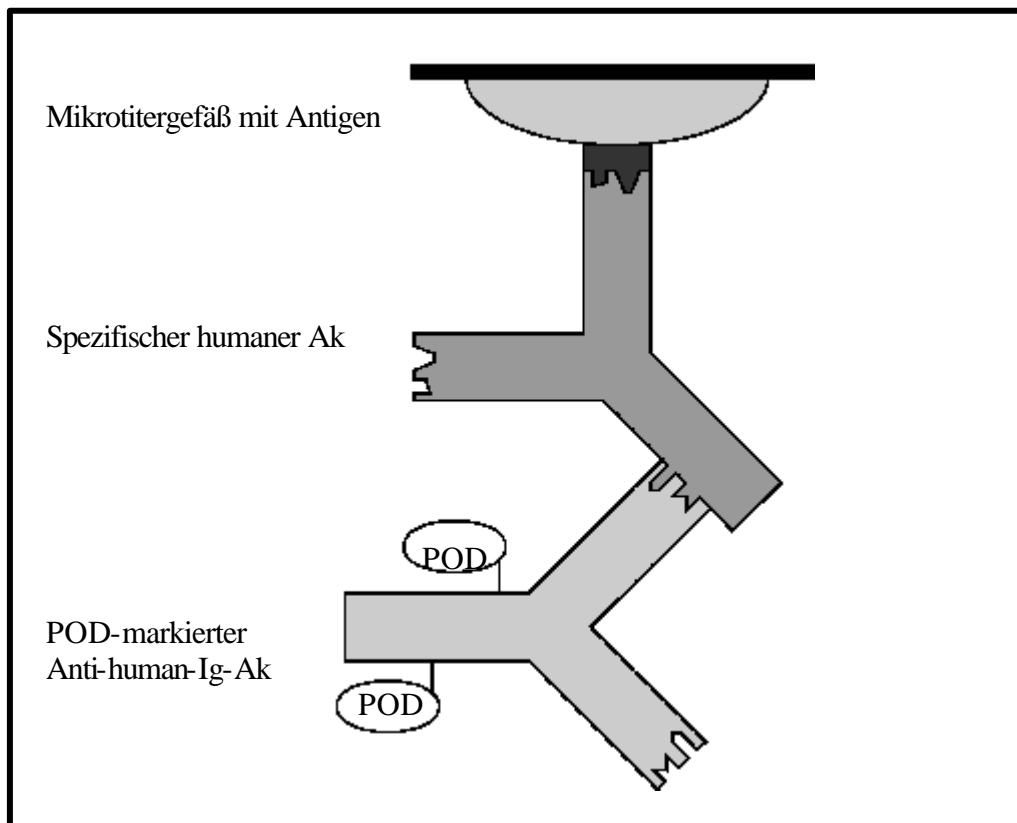
### 3.3.1 Antikörper-ELISA

#### Prinzip des Antikörper-ELISA:

Als antigenhaltige Festphase werden Mikrotiterplatten mit aufgereinigtem LPS verwendet. Im ersten Inkubationsschritt binden sich bei positiven Proben die nachzuweisenden Antikörper aus dem verdünnten Patientenserum an die festphasegebundenen Antigene.

Im zweiten Inkubationsschritt werden die gebundenen Antikörper mit POD-markierten Anti-Human-Ig-Antikörpern nachgewiesen.

Im dritten Inkubationsschritt werden die gebundenen Antikörper durch eine Farbreaktion mit der TMB-Lösung dargestellt. Die Extinktion der entstehenden Farblösung ist proportional zur Antikörper-Konzentration im Patientenserum.



**Abb.1: Prinzip des Antikörper-ELISA:**

Polysorbplatten wurden mit 1:20 verdünntem LPS inkubiert und positive und negative Probeseren in unterschiedlichen Verdünnungen zugegeben. Waren Antikörper gegen *Francisella tularensis* vorhanden, banden diese an das LPS und konnten durch Zugabe von markierten Antihuman-Ig-Antikörpern (polyvalentes Ig-POD) und die anschließende Substratreaktion (TMB => Farbstoff) durch Bestimmung der Extinktion mengenmäßig bestimmt werden.

### **Material:**

- LPS *Francisella tularensis*
- Verdünnungspuffer
- Polysorb-Platten *Nunc, Wiesbaden, Germany*
- Coating Puffer
- Ziegenserum
- PBS/Tween 0,05% (Waschpuffer)
- Positiv- und Negativkontrolle
- Polyvalentes Ig-POD *Sigma, Taufkirchen, Germany*
- 66% TMB *Seramun, Dolgenbroth, Germany*
- 2,5 N Schwefelsäure

### **Testdurchführung:**

Coating                      Verdünnung des LPS 1:20 in Coating Puffer und Zugabe von je 50 µl in jedes Well der Polysorb-Platte. Inkubation für 1 Stunde bei 37°C oder im Kühlschrank bei 4°C über Nacht.

4 x Waschen mit PBS/Tween 0,05%    (ca.200 µl/well)

Blocken                      Ziegenserum wurde 1:10 in PBS/Tween verdünnt, in jedes Well pipettiert und bei 37°C für 30 min inkubiert.

4 x Waschen mit PBS/Tween 0,05%    (ca.200 µl/well)

Seren Für jedes Serum wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (1:20, 1:40 bis 1:10240 in Ziegen Serum). Je Well wurden 50 µl Serumverdünnung bzw. Positiv- oder Negativkontrolle (1:500) zugegeben und für 1 Stunde bei 4°C inkubiert.

4 x Waschen mit PBS/Tween 0,05% (ca.200 µl/well)

Konjugatreaktion 50 µl in Ziegen Serum 1:2000 verdünntes Konjugat (polyvalentes Ig-POD) wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

6 x Waschen mit PBS/Tween 0,05% (ca.200 µl/well)

Substratreaktion Das Substrat wurde in der gleichen Reihenfolge und Geschwindigkeit wie zuvor das Konjugat zugegeben, d.h. 50 µl 66% TMB wurden zügig in jedes Well pipettiert. Nach 15 Min wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 N Schwefelsäure gestoppt.

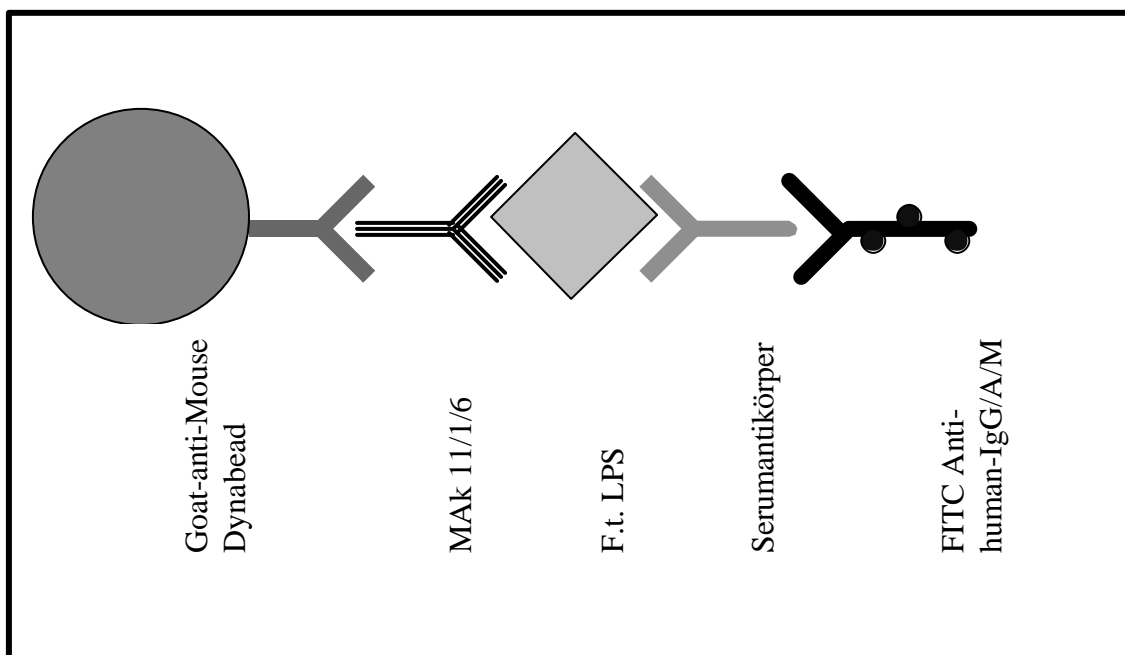
Die Adsorptionsmessung erfolgte im ELISA-Reader Digiscan, die anschließende Auswertung mittels MikroWin 3.0 Programm.

### 3.3.2. Durchflußzytometrie

#### Prinzip der DFZ:

Die Durchflußzytometrie stellt ein optisches Meßsystem für einzelne in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikeln dar, welche mit geeigneten Fluorochromen markiert werden und quantitativ sowie qualitativ bestimmt werden. Das Anwendungsspektrum reicht von Zelltypisierung über Zellzyklusanalysen bis hin zur Untersuchung intrazellulärer Stoffwechselfvorgänge.

Die mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbten Partikeln werden kontinuierlich hintereinander durch eine Kapillare an einer Laselichtquelle vorbeigeführt. Aufgrund der Fluoreszenzanregung des Farbstoffs emittiert jedes Teilchen ein Lichtsignal proportional zu gebundenen Fluorochrommenge. Dieses Lichtsignal wird in ein elektrisches Signal umgewandelt und in einem Photomultiplier verstärkt. Die Empfindlichkeit des Photomultipliers ist abhängig von der angelegten Hochspannung. Passiert ein Partikel die Messpore, so steigt das Fluoreszenzlicht bis auf ein Maximum an und fällt anschließend auf das Gleichgewichtsniveau zurück. Die Durchflussrate (Partikeln/Zeit) wird über die eingehenden Signale berechnet und digital angezeigt. Die so gewonnenen Daten werden in Form von Histogrammen visualisiert und abgespeichert.



**Abb. 2: Schematische Darstellung eines beladenen Beads**

Goat-anti-Mouse Dynabeads wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen *Francisella tularensis* inkubiert und anschließend LPS-Antigenen hieran gebunden. In Positivseren vorhandene humane Antikörper banden sich an das LPS und wurden durch FITC-markiertes Antihuman-Immunglobulin markiert. Je stärker positiv ein Serum war, desto stärker das Lichtsignal der Probe.

### Material:

Goat-anti-Mouse Dynabeads

*Sigma, Taufkirchen, Germany*

MAk 11/1/6

F.t. LPS OD=1,0

FITC anti human IgG/A/M (Ziege!)

*Sigma, Taufkirchen, Germany*

FACS-Puffer

FACS-Röhrchen

Überkopfschüttler

Dynabeads-Magnet

*Dynal, Oslo, Norwegen*

### Testoptimierung:

Die Durchflußzytometrie stellt bereits in vielen Bereichen ein standardisiertes Testverfahren dar. Um diese Methode auch zum direkten Antikörpernachweis aus Seren anzuwenden, waren umfangreiche Vortests erforderlich um für jedes verwendete Reagenz die jeweils optimale Verdünnung, Inkubationstemperatur, -dauer und –modus zu finden und eine hohe Trennschärfe zwischen positiven und negativen Signalen zu ermitteln.

Im Lauf der Testoptimierung erwies sich die DFZ als probates Mittel zum direkten *Francisella tularensis* -Antikörpernachweis aus Humansenen.

Folgende Faktoren wurden in den Vortests durchlaufend variiert:

- mAk 11/1/16                    10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml
- Ag =LPS                        1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:100
- Serumverdünnung            1:30, 1:90 bis 1:810
- Anti-human FITC            1:25, 1:50, 1:100    von Sigma (Ziege) und Dako (Kaninchen)
- Inkubationstemperatur      4°C und 37°C

- Inkubationsdauer      Serum: 60, 30, 15, 5 min      Konjugat 30, 15, 10 min

Mit den Ergebnissen dieser Vortests (Kap. 4.2) wurde folgendes Schema zur Testung der 100 Probeseren ausgearbeitet:

### **Testdurchführung:**

#### **a.) Waschen der Dynabeads:**

In Eppendorf caps wurden 5 µl Beads in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen (ausreichend für 10 Ansätze), gevortext und in den Magnet gestellt. Hatten sich die Beads an der Rückwand gesammelt, wurde vorsichtig die Flüssigkeit abgesaugt. Erneut wurde 1 ml FACS-Puffer zugegeben und der Waschschrift noch zweimal wiederholt.

Die folgenden Inkubationsschritte erfolgten alle bei Raumtemperatur und unter Bewegung (z.B. in einem Überkopfschüttler) um eine gute Durchmischung zu gewährleisten, indem das Herabsinken der Dynabeads durch die ständige Rotation verhindert wurde.

#### **b) Inkubation mit mAk 11/1/6:**

984 µl FACS-Puffer und 16 µl mAk ( 2,5 mg/ml , EndKonz. 40 µg/ml ) wurden 30 min mit den Beads inkubiert.

3 mal Waschen in 1 ml FACS-Puffer

#### **c) Inkubation mit dem LPS:**

*F.t.* LPS wurde 1:2 in 500 µl FACS-Puffer verdünnt und 30 min mit den Beads inkubiert.

3 mal Waschen, Wiederaufnehmen der Beads in 1 ml FACS-Puffer und Verteilung auf 10 Röhrchen a 100 µl.



d) Serum-Inkubation:

Von den 1:12,5 in FACS-Puffer vorverdünnten Seren und der Positiv- und Negativkontrolle wurden je 100  $\mu$ l in ein Röhrchen mit 100  $\mu$ l vorbehandelten Beads gegeben (Endverdünnung 1:25) und für 60 min inkubiert.

3 mal Waschen in 1 ml FACS-Puffer

e) Inkubation mit dem FITC-markierten Ak:

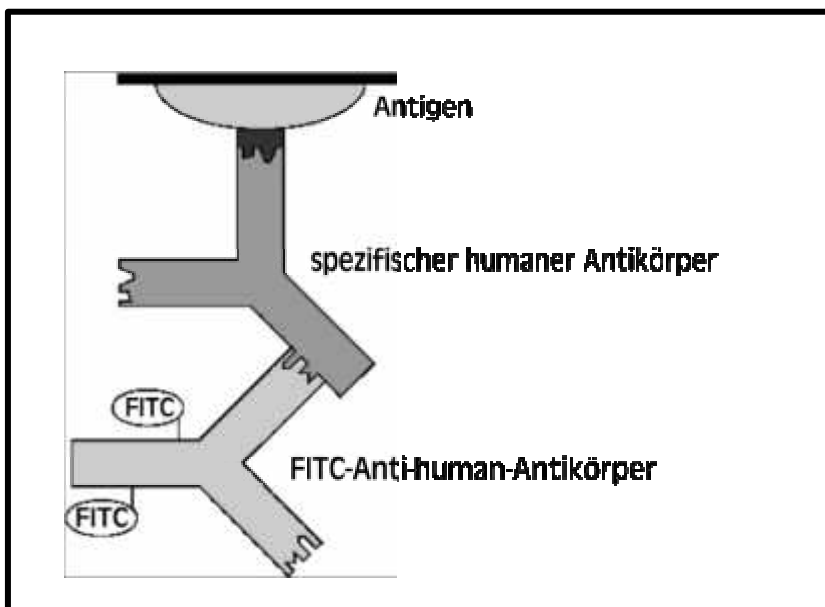
Polyvalentes FITC-markiertes Anti-human-Immunglobulin wurde 1:100 in FACS-Puffer verdünnt und 200  $\mu$ l in jedes Röhrchen pipettiert und 30 min inkubiert.

1 mal Waschen, in 500  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Tubes überführt.

### 3.3.3. Immunfluoreszenz

#### Prinzip der IF:

Als Antigen dient *Francisella tularensis*-Suspension, die an die Glasoberfläche von Objektträgern fixiert wurde. In einem ersten Inkubationsschritt binden sich bei positiven Proben die nachzuweisenden Antikörper aus dem verdünnten Patientenserum an die Festphase-gebundenen Antigene. Im zweiten Inkubationsschritt werden diese Antikörper mit Fluorescein-markierten Anti-Human-Ig-Antikörpern sichtbar gemacht und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Fluoreszenzstärke ist proportional zum Antikörpergehalt eines Serums.



**Abb.3: Prinzip der Immunfluoreszenz:**

Bakteriensuspension wurde auf die Felder des Objektträgers aufgetragen und mit Methanol fixiert, ein Tropfen der Serumverdünnung pro Feld aufgetragen, in der feuchten Kammer inkubiert und vorsichtig vom Rand des Wells abgesaugt. Auf die gewaschenen und getrockneten Objektträger wurde der FITC-markierte Anti-human-Antikörper gegeben und die Fluoreszenz mit Deckgläsern und DAKO Fluorescent Mounting Medium fixiert.

### **Material:**

- LVS OD<sub>560nm</sub> = 1,0
- PBS
- Methanol
- Feuchte Kammer
- FITC Antikörper *Dako, Hamburg, Germany*
- 0,5% Evans blue *BioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich*
- DAKO Fluorescent Mounting Medium *Dako, Hamburg, Germany*
- Deckgläser *BioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich*
- IF-Objektträger, 10 Felder *BioMerieux, Marcy l'Etoile, Frankreich*

### **Testdurchführung:**

Das Antigen wurde 1:20 in PBS verdünnt und gut gemischt. Auf jedes Well wurden senkrecht 20 µl der Bakteriensuspension aufgetragen. Nachdem die Felder des Objektträgers über Nacht getrocknet waren, wurden sie am nächsten Tag in Methanol 1 min fixiert und getrocknet. Die Seren wurden 1:20, 1:40 bis 1:10240 in PBS verdünnt, 20 µl auf jedes Well aufgetragen und in einer feuchten Kammer 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nun wurden die Tröpfchen vorsichtig vom Rand des Wells aus abgesaugt, die Objektträger kurz mit PBS abgespült, in eine PBS gefüllte Glaswanne überführt und 5 min darin auf dem Schüttler gewaschen. Der Vorgang wurde in einer neuen Wanne für 10 min wiederholt. Die Objektträger wurden anschließend getrocknet.

Der FITC Antikörper wurde 1:100 in PBS verdünnt und 0,5% Evans Blue zugeben. Jeweils 20 µl wurden aufgetropft und 30 min bei 37°C inkubiert (feuchte Kammer) und anschließend wieder 2 mal in PBS und abschließend 1 mal in Aqua dest gewaschen. Zum längeren Erhalt der Fluoreszenz wurden die Objektträger mit DAKO Fluorescent Mounting Medium betropft und mit Deckgläsern versehen.

Die Auswertung der fixierten Objektträger erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop nach folgenden Kriterien:

++++	sehr starke Immunfluoreszenz <u>mit Hof</u>
+++	starke Immunfluoreszenz
++	gute Immunfluoreszenz
+	schwache Immunfluoreszenz
-	keine Immunfluoreszenz

### 3.3.4. Westernblot

#### Westernblot-Prinzip:

Als antigenhaltige Festphase werden Blotstreifen verwendet, die elektrophoretisch aufgetrennte Antigengemische (hier: Bakterienlysate) enthalten. Die Position der Proteine ist dabei von deren Molekulargewicht abhängig.

Im ersten Inkubationsschritt binden sich bei positiven Proben die nachzuweisenden Antikörper aus dem verdünnten Patientenserum an die membrangebundenen Antigene.

Im zweiten Inkubationsschritt reagieren diese Antikörper mit POD-markierten Anti-Human-Ig-Antikörpern.

Im dritten Inkubationsschritt werden die gebundenen Antikörper durch eine Farbreaktion mit einer Substratlösung dargestellt. Sind spezifische Antikörper im Serum des Patienten vorhanden, führt präzipitierendes Substrat zur Ausbildung der Banden.

Bei der Auswertung der Bandenmuster auf dem inkubierten Blotstreifen wird zwischen nichtspezifischen und spezifischen Antikörpern unterschieden. Die Anzahl und Ausprägung der spezifischen Banden entscheidet über die Befundung positiv oder negativ.

Das Antigen-Antikörperschema ist mit dem des ELISA (Abb.1) identisch.

**Material:**

- Sample Puffer
- LVS OD= 2,5
- Mercaptoethanol
- 4-20% Tris-Glycin-Gel 2D Well      *Invitrogen, Karlsruhe, Germany (früher Novex)*
- Tris-Glycin-Puffer      *Invitrogen, Karlsruhe, Germany*
- Aqua dest
- Marker      *Invitrogen, Karlsruhe, Germany*
- Elektrophorese-Kammer      *Invitrogen, Karlsruhe, Germany*
- Blotting Puffer
- Nitrozellulose, Filter      *Invitrogen, Karlsruhe, Germany*
- Blot Kammer      *Invitrogen, Karlsruhe, Germany*
- Magermilchpulver
- TBS Puffer
- MilliQ-Wasser
- Ziegenerum
- PBS
- Waschpuffer
- Ig A/G/M
- TMB-Substrat (precipitating)      *Seramun, Dolgenbroth, Germany*
- Aqua dest

### **Herstellung der Blotstreifen *F. tularensis*:**

#### **a) Probenvorbereitung:**

Aufgetautes LVS OD=2,5 wurde mit Sample Puffer 1:2 verdünnt, 30 µl Mercaptoethanol zugegeben und 15 min gekocht, dann 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde 20 min lang bei 10.000 U/min zentrifugiert.

#### **b) Gelvorbereitung:**

Die Wells wurden 3-4 mal mit Tris-Glycin-Puffer gespült. 8 µl Marker und 250 µl Probe wurden in die jeweilige Tasche pipettiert, die Gele in die Elektrophoresekammer gestellt und diese mit Puffer bis über beide Taschen aufgefüllt.

#### **c) Elektrophorese:**

Bei 130 Volt/ ca.80 Mille-Ampere für ca.1,5 Stunden, bis der Marker den unteren Bereich erreicht hat.

#### **d) Blotten:**

1 Stunde bei 30 Volt; anschließend wurde die Nitrozellulose in 5% Magermilchpulver in TBS-Puffer über Nacht bei 4°C geblockt, mit Weichwasser abgespült und in ca. 3 mm breite Blotstreifen geschnitten. Diese konnten mehrere Wochen in Röhrchen bei 4°C aufbewahrt werden.

### **Testdurchführung:**

Die Seren wurden in 10%igem Ziegenserum 1:250, 1:500, 1:1000 und 1:2000 verdünnt, die Positivkontrolle 1:1000. Pro Kammer wurden je 2 ml Serumverdünnung eingefüllt. Die Blotstreifen wurden 2 Stunden auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Verdünntes Serum wurde abgesaugt und die Streifen 3 mal mit dem Waschpuffer (ca. 2 ml) gewaschen. Nun wurde das polyvalente Konjugat 1:1000 in Waschpuffer verdünnt und je Kammer 2 ml davon 1 Stunde inkubiert. Erneut wurde 3 mal gewaschen. Zur Entwicklung der Blots wurde je 1 ml TMB-Substrat zugegeben und die Reaktion nach 10 Minuten mit Aqua dest gestoppt. Abschließend wurden die Blotstreifen 1 mal in destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet.

### 3.3.5. IMB-Agglutinationstest

#### Prinzip der Agglutination:

In Anwesenheit spezifischer Antikörper (Agglutinine) kommt es im Äquivalenzbereich von Antikörpern und Antigen (Heidelberger Kurve) zur Zusammenballung von Zellen oder Blutkörperchen.

#### Material:

- Rundbodenplatte *Nunc A/S, Kamstrup, Dänemark*
- LPS OD 2,5 ,verdünnt 1:20
- Positiv- und Negativkontrolle
- NaCl 0,85%

#### Testoptimierung:

Um die für den *Francisella-tularensis*-Antikörper-Nachweis beste Serum- und Antigenverdünnung zu finden, wurde eine Schachbretttitration in 4 Rundbodenplatten durchgeführt. Hierzu wurde das LPS 1:2 bis 1:2560 verdünnt. Das Positivserum wurde 1:2 bis 1:256 verdünnt. Als Kontrolle wurde NaCl durch alle Antigenverdünnungsstufen mitgeführt. Die Platten wurden ca. 1 min auf den Schüttler gestellt um ein gutes Durchmischen des Well-Inhaltes zu gewährleisten. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C für 24 h, anschließend wurde abgelesen.

#### Ergebnisse der Schachbretttitration:

Antigenverdünnungen bis 1:20 zeigten eine deutliche Agglutination, ab einer Verdünnung von 1:40 aufwärts kam es aufgrund der geringen Bakterienmenge zu keiner ausreichenden Agglutination mehr. Eine Auswertung war ab 1:40 deshalb nicht mehr möglich.

Das positive Probeserum agglutinierte in allen Verdünnungsstufen, nur die Stärke (+ bis +++) war von der jeweiligen Antigen-Menge mitbeeinflusst.

Als optimal erwies es sich die Serumverdünnung von 1:2 bis 1:256 bei einer Antigenkonzentration von 1:20 zu testen.

#### **Testdurchführung:**

Das Antigen wurde 1:20 in 0,85% NaCl verdünnt und eine Serumverdünnungsreihe 1:2 bis 1:128, ebenfalls in NaCl verdünnt, hergestellt. In jedes Well wurden nun 50 µl Antigen und 50 µl Serum bzw. Serumverdünnung pipettiert. Die Platte wurde geschüttelt und 20-24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### **3.3.6. DIFCO-Agglutinationstest**

Es wurden 4 verschiedene Ansätze getestet. Ansatz 1 und 2 beruhen ausschließlich auf den Herstellerangaben. Die Ansätze 3 und 4 wurden in Anlehnung an den mit eigenem Antigen durchgeführten Agglutinationstest durchgeführt.

Hierfür wurden zunächst bekannte, d.h. vorgetestete und im Institut häufig verwandte stark positive Humansenen verwendet.

Zusätzlich wurde eine Schachbrettitation mit positivem Kaninchenserum durchgeführt.

#### **Material:**

- DIFCO *Francisella tularensis* Antigen für die Objektträgeragglutination
- DIFCO *Francisella tularensis* Antigen für die Röhrenagglutination
- DIFCO *Francisella tularensis* Positivkontrolle *Becton Dickinson, Heidelberg,*
- 0,85% NaCl *Germany ( früher Difco)*
- Positiv- und Negativkontrolle
- Serumproben
- Rundbodenplatte *Nunc A/S, Kamstrup, Dänemark*



### **1. Ansatz: Objektträger-Methode**

In die Vertiefungen einer Rundbodenplatte wurden 5, 10, 20, 40 und 80 µg Serum gegeben und jeweils 50 µg DIFCO-Antigen („1 Tropfen“) für die Objektträgeragglutination zugegeben. Die Platte wurde gut geschwenkt und nach 1 min abgelesen.

### **2. Ansatz: Röhren-Methode**

Serum wurde 1:10 in NaCl vorverdünnt und damit eine Serum-Verdünnungsreihe bis 1:640 hergestellt. Zugabe von 0,5 ml DIFCO-Antigen für die Röhren-Agglutination. Die Endverdünnungen betragen 1:20, 1:40 bis 1:1280. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad, bei 37°C für 20 bis 24 Stunden.

Da die vorhergehenden Ansätze keine eindeutige Agglutination zeigten, wurde versucht durch Variation der Konzentrationen, Mengen und Inkubationszeiten mögliche Wechselwirkungen der Reagenzien untereinander auszuschließen und ähnlich wie beim IMB-Agglutinationstest eine Agglutination zu bekommen.

### **3. Ansatz: Mikroversion Objektträger-Methode**

Herstellung einer Serum-Verdünnungsreihe mit NaCl in einer Rundbodenplatte und Zugabe von je 50 µl DIFCO-Antigen für die Objektträgeragglutination (Endverdünnungen 1:2, 1:4, 1:8, bis 1:256). Nach mehrmaligem, gutem Schwenken wurde 20 bis 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

### **4. Ansatz: Mikroversion Röhren-Methode**

Analog zu Ansatz 3 wurde hier nur das farblose DIFCO-Antigen für die Röhrenagglutination verwendet.

## **3.4 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Tests erfolgte unter Zuhilfenahme der Programme Excel und SPSS. Bei SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) handelt es sich um ein amerikanisches Statistikprogramm, welches bei dem Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie in einem mehrtägigen Kurs erlernt wurde.

Kernstück für den abschließenden Methodenvergleich waren die Sensitivität und Spezifität eines jeden durchgeführten Testverfahrens.

Die Sensitivität gibt die Zahl der falsch negativen Ereignisse geteilt durch die Gesamtzahl aller negativen Ereignisse wieder.

Die Spezifität berechnete sich als Quotient aus den falsch positiven Ereignissen und der Gesamtzahl aller positiven Ereignisse.

### **3.4.1 Antikörper-ELISA**

Die Messung der Mikrotiterplatten im MikroWin 3.0 Programm lieferte eine Vielzahl an Daten. Die Positiv- und Negativkontrolle errechnete sich auf jeder Platte als Mittelwert aus vier Wells gleichen Inhalts. Die Seren wurden alle in Doppelreihen gemessen und jeweils der Mittelwert aus beiden Wells gebildet. Auf diese Weise wurde versucht eventuelle Pipettier- und Messfehler möglichst auszuschließen.

Zum Überblick wurde für die Gruppe der Positiv- und Negativseren in allen Verdünnungsstufen der jeweilige Extinktionsmittelwert berechnet :

Tab.3: ELISA-Mittelwerte:

Verdünnung		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
	<b>Seren</b>										
<b>Mittelwert</b>	positiv	1,62	1,65	1,6	1,59	1,51	1,38	1,19	0,91	0,61	0,4
	negativ	1,26	1,08	0,83	0,64	0,36	0,20	0,12	0,06	0,04	0,03
<b>Median</b>	positiv	1,61	1,66	1,61	1,61	1,54	1,43	1,28	0,96	0,62	0,32
	negativ	1,28	1,15	0,85	0,53	0,30	0,16	0,09	0,04	...	...
<b>Standardabw.</b>	positiv	0,14	0,12	0,12	0,14	0,18	0,26	0,34	0,38	0,38	0,29
	negativ	0,26	0,31	0,33	0,59	0,25	0,16	0,09	0,05	...	...
<b>Varianz</b>	positiv	0,019	0,093	0,015	0,020	0,03	0,066	0,114	0,141	0,138	0,080
	negativ	0,065	0,015	0,110	0,098	0,06	0,026	0,009	0,003	0,001	0,000
<b>Minimum</b>	positiv	1,30	1,32	1,34	1,15	0,84	0,55	0,27	0,12	0,05	0,33
	negativ	0,42	0,22	0,13	0,08	0,05	0,03	0,003	0,002	-0,004	
<b>Maximum</b>	positiv	1,89	1,86	1,83	1,81	1,78	1,76	1,70	1,61	1,53	1,32
	negativ	1,68	1,61	1,50	1,18	1,07	0,77	0,46	0,25	0,15	0,08
<b>25%Quartile</b>	positiv	1,55	1,59	1,55	1,54	1,43	1,23	0,97	0,62	0,33	0,19
	negativ	1,15	0,88	0,55	0,31	0,17	0,17	0,08	0,05	...	...
<b>75%Quartile</b>	positiv	1,70	1,73	1,69	1,69	1,65	1,56	1,44	1,19	0,85	0,52
	negativ	1,42	1,32	1,07	0,78	0,47	0,25	0,14	0,07	0,05	...

Zur Berechnung der Signifikanz des ELISA wurden im SPSS-Programm Tests zum Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben ( Positivserum, Negativserum ) verwendet:

Wilcoxon-Test und Mann-Whitney-U-Test sind Teststatistiken, der Z-Wert gibt die Normalapproximation der Teststatistiken U und W wieder.

Die Funktion Asymptotische Signifikanz (2-tailed) entspricht dem p-Wert zu Z (zweiseitig).

Die Testergebnisse zur Trennschärfe des ELISA sind in Kapitel 4.1 tabellarisch aufgeführt und erläutert.

Die Gegenüberstellung von Sensitivität und Spezifität mit Hilfe der ROC-Kurve wurde ebenfalls im SPSS-Programm erstellt und erfolgte für die am besten trennenden Verdünnungsstufen (1:320, 1:640, 1:1280).

Zumal bei einer Serumverdünnung von 1:500 bereits eine große Anzahl von Seren mit dem Antikörper-ELISA im Institut getestet worden waren und so eine Vergleichs- und Kontrollmöglichkeit mit Vorergebnissen (z.T. IgA, IgG und IgM separat bestimmt) bestand.

### **3.4.2 Durchflußzytometrie**

Die Beads wurden im Vorwärts-/Seitenscattergramm erfaßt. Die Messung aller Seren erfolgte in dem gleichen Gate. In diesem Gate lagen stets mehr als 99% der Events. Gezählt wurden durchschnittlich ca. 2000 Partikeln je Serum.

Bei diesem Verfahren wurden jeweils der Mittelwert (MnX), der Median (MdX) und die Position des Peaks (PkPosX) der Fluoreszenzintensität bestimmt. Von den gewonnenen Daten wurde nur der Mittelwert der Fluoreszenzintensität eines jeden Serums zu weiteren Berechnungen herangezogen. Der ebenfalls berechnete Median stimmte immer bis mindestens zur ersten Stelle hinter dem Komma mit dem Mittelwert überein und wurde deshalb keiner separaten statistischen Auswertung unterzogen. Die Peak-Position unterlag den anderen beiden Werten an Genauigkeit und wurde deshalb nicht weiter verwandt.

### **3.4.3 Immunfluoreszenz**

Die Immunfluoreszenz als subjektives Verfahren wird mikroskopisch beurteilt. Allgemeine statistische Größen wurden mit Excel berechnet und für unterschiedlich definierte Titer gegenübergestellt und der cut off ermittelt.

### **3.4.4 Westernblot**

Die Auswertung der Blotstreifen erfolgte nach einer kurzen Trockenphase.

Nur Blotstreifen, welche das charakteristische Strickleitermuster des LPS von *Francisella tularensis* aufwiesen, wurden als positiv gewertet. Trat dieses Bandenmuster nicht auf, so handelte es sich um ein negatives Ergebnis.

Als Titer galt die letzte Verdünnung, bei der auf dem Blotstreifen das Strickleitermuster eindeutig erkennbar war.

### **3.4.5 IMB-Agglutinationstest**

Als Titer wurde bei diesem Test jene Verdünnung definiert, welche als letzte eine eindeutige Agglutination der Stärke (+) zeigte. Die Ergebnisse wurden tabellarisch mit Excel aufgeführt.

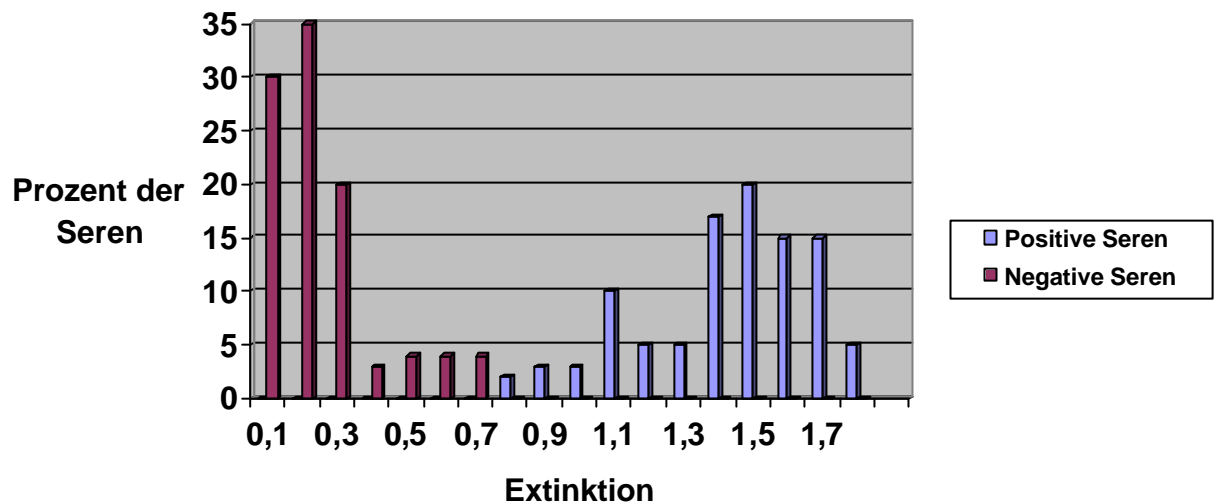
### **3.4.6 DIFCO- Agglutinationstest**

In keinem der Ansätze war eine Agglutination ablesbar. Somit war auch keine statistische Auswertung zu erheben.

## 4. Ergebnisse der Serodiagnostik

### 4.1 ELISA

Zunächst wurde der Screening ELISA, welcher bereits in der Routinediagnostik verwendet wird, als Referenztest geprüft. Graphisch verteilen sich die Ergebnisse wie folgend:



**Abb.4: Prozentuale Verteilung der Positiv- und Negativseren**

Der Mann-Whitney-Test zeigte, dass der ELISA in allen Verdünnungen signifikant ist, wobei der Verdünnungsbereich 1:320 bis 1:1280 von allen getesteten Verdünnungen, am besten zwischen positiv und negativ trennte.

Zur Berechnung der Signifikanz für die verschiedenen Verdünnung wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Der Bereich zwischen 1:320 und 1:1280 trennte am besten zwischen positiv und negativ (violett unterlegt).

**Tab.4: Signifikanzberechnung für den ELISA:**

Verd.	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Asymp.Sig.(2-tailed)
1:20	223,000	1549,000	-7,078	0,000
1:40	53,000	1379,000	-8,250	0,000
1:80	17,000	1343,000	-8,498	0,000
1:160	55,000	1381,000	-8,236	0,000
1:320	4,000	1330,000	-8,588	0,000
1:640	4,500	1330,500	-8,585	0,000
1:1280	4,500	1330,500	-8,585	0,000
1:2560	7,000	1333,000	-8,567	0,000
1:5120	21,000	1347,000	-8,471	0,000
1:10240	37,000	1363,000	-8,362	0,000

Die in der Tabelle angeführten Tests dienen der Signifikanzberechnung. Die asymptotische Signifikanz (Asymp. Sig.) entspricht hierbei dem p-Wert. Der unterlegte Bereich weist die höchste Signifikanz auf.

Für diese Verdünnungen wurden mit Hilfe einer ROC-Kurve Sensitivität und Spezifität berechnet und tabellarisch gegenübergestellt.

**Tab.5: Abhängigkeit von Sensitivität und Spezifität beim ELISA**

Sensitivität in %	Spezifität in %	Extinktionswert bei der Verdünnung			
		1:320	1:640	1:1280	
100	80,4	0,541	0,264	0,153	
100	82,4	0,556	0,278	0,17	
100	84,3	0,581	0,294	0,185	
100	86,3	0,655	0,299	0,209	
100	88,2	0,725	0,357	0,234	
100	90,2	0,742	0,421	0,25	
100	92,2	0,794	0,488	0,265	=> keine falsch negativen Testseren
98	92,2	0,862	0,57	0,286	
98	94,1	0,894	0,592	0,326	
98	96,1	0,915	0,623	0,378	
98	98	0,999	0,707	0,437	
95,9	100	1,083	0,846	0,516	=> keine falsch positiven Testseren
93,9	100	1,159	0,936	0,583	
91,8	100	1,242	0,986	0,614	
89,8	100	1,276	1,035	0,66	
87,8	100	1,298	1,053	0,699	
85,7	100	1,314	1,062	0,777	
83,7	100	1,335	1,091	0,871	
81,6	100	1,361	1,157	0,914	
79,6	100	1,377	1,204	0,937	

Farbig unterlegt sind die Extinktionswerte, bei welchen es als Cut off keine falsch positiven bzw. negativen Ergebnisse gibt.

Abhängig vom jeweiligen Verdünnungsbereich und der gewünschten Sensitivität bzw. Spezifität sind in der obigen Tabelle die Extinktionswerte angegeben, ab welchen ein gemessenes Serum als positiv einzustufen ist. Unplausible Ergebnisse wurden mindestens noch einmal wiederholt und nur bestätigte Ergebnisse bei der Auswertung verwendet.

In der Diagnostik ist es besonders wichtig möglichst keine falsch negativen Ergebnisse zu erhalten. Deshalb wurde bei der Festlegung des Cut offs darauf geachtet, dass der ELISA eine Sensitivität von 100% erhielt.

Getestete Seren, die bei

- der Verdünnung 1:320 eine Extinktion ? 0,794
- der Verdünnung 1:640 eine Extinktion ? 0,488
- und der Verdünnung 1:1280 eine Extinktion ? 0,265

aufweisen sind als positiv zu werten. Die Spezifität beträgt bei diesem Cut off 92,2%.

## 4.2 DFZ

Während die Durchflußzytometrie in der Zelltypisierung bereits weit fortgeschritten ist, befindet sich diese Methode zum Antikörpernachweis aus Patientenserum noch in der Entwicklung.

### Testoptimierung:

Durch Modifikationen in den Reagenzienkonzentrationen, dem Inkubationsmodus und nicht zuletzt der Computereinstellung wurde letztendlich eine zuverlässige Diskrimination zwischen positiven und negativen Seren erreicht.

Zunächst zeigte sich, daß das Konjugat z.T. direkt an die Beads band. Deshalb wurden die Beads vor Testdurchführung mit 10%igem Ziegen- bzw. Kaninchenserum geblockt und



anschließend im normalen Testablauf mitgemessen. Das Blocken bewirkte jedoch keinen Unterschied zu den nicht geblockten Beads.

Deshalb wurde ein Teil des Konjugats speziell adsorbiert. Es wurde hierfür 1:5 in FACS-Puffer verdünnt und 30 min mit 5 µl Beads inkubiert, anschließend die Beads verworfen und der Überstand vorsichtig abpipettiert und in FACS-Puffer 1:10 wieder aufgenommen. Abermals wurden 5 µl Beads für 30 min zugegeben, gewaschen und der Überstand mit dem adsorbierten FITC-Konjugat aufgehoben. Der Adsorptionsvorgang veränderte das Bindungsverhalten jedoch nicht.

Eine Konjugatverdünnung von 1:100 reduzierte die direkte Reaktion mit den Beads zwar Voraussetzung war aber die ausreichender Markierung der positiven Seren mit dieser Konjugatmenge.

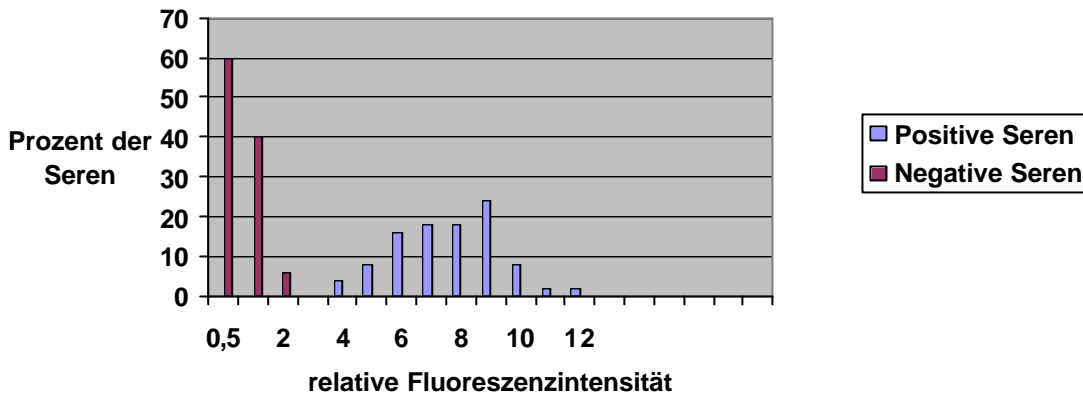
Durch letztendliche Verwendung des Konjugats von Sigma (das FITC-markierte polyvalente Anti-human-Immunglobulin von Dako wird im Kaninchen generiert, das von Sigma dagegen in der Ziege) konnte das Problem der unspezifischen Bindung auf einfache Art und Weise gelöst werden. Das Blocken der Goat-anti-Mouse Beads wurde überflüssig.

Nachdem die Inkubationstemperatur (4°C, 20°C, 37°C) keinen Unterschied in Bezug auf die Messergebnisse erkennen ließ, wurden die weiteren Untersuchungen bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Dauer der Inkubation dagegen zeigte signifikante Unterschiede. Als optimal erwiesen sich 60 min für die Seren und 30 min für das Konjugat. Kürzere Inkubationszeiten führten zu einer schlechteren Trennung zwischen positiven und negativen Seren. Eine weitere Verlängerung der Inkubationszeiten führte zu keiner zusätzlichen Erhöhung der Trennschärfe.

Dagegen wurde durch eine Erhöhung der Konzentration der Beschichtungsreagenzien (mAK 11/1/6 auf 40 µg/ml) und eine LPS-Erhöhung auf 1:2 (bezogen auf die Ausgangskonzentration) eine sehr viel bessere Trennschärfe erreicht.

Die optimale Serumverdünnung lag bei 1:25. Hier wurden die größten Differenzen zwischen den positiven und negativen Proben gemessen.



**Abb.5: Prozentuale Verteilung der Seren in der Durchflußzytometrie**

Die Daten beider Testgruppen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

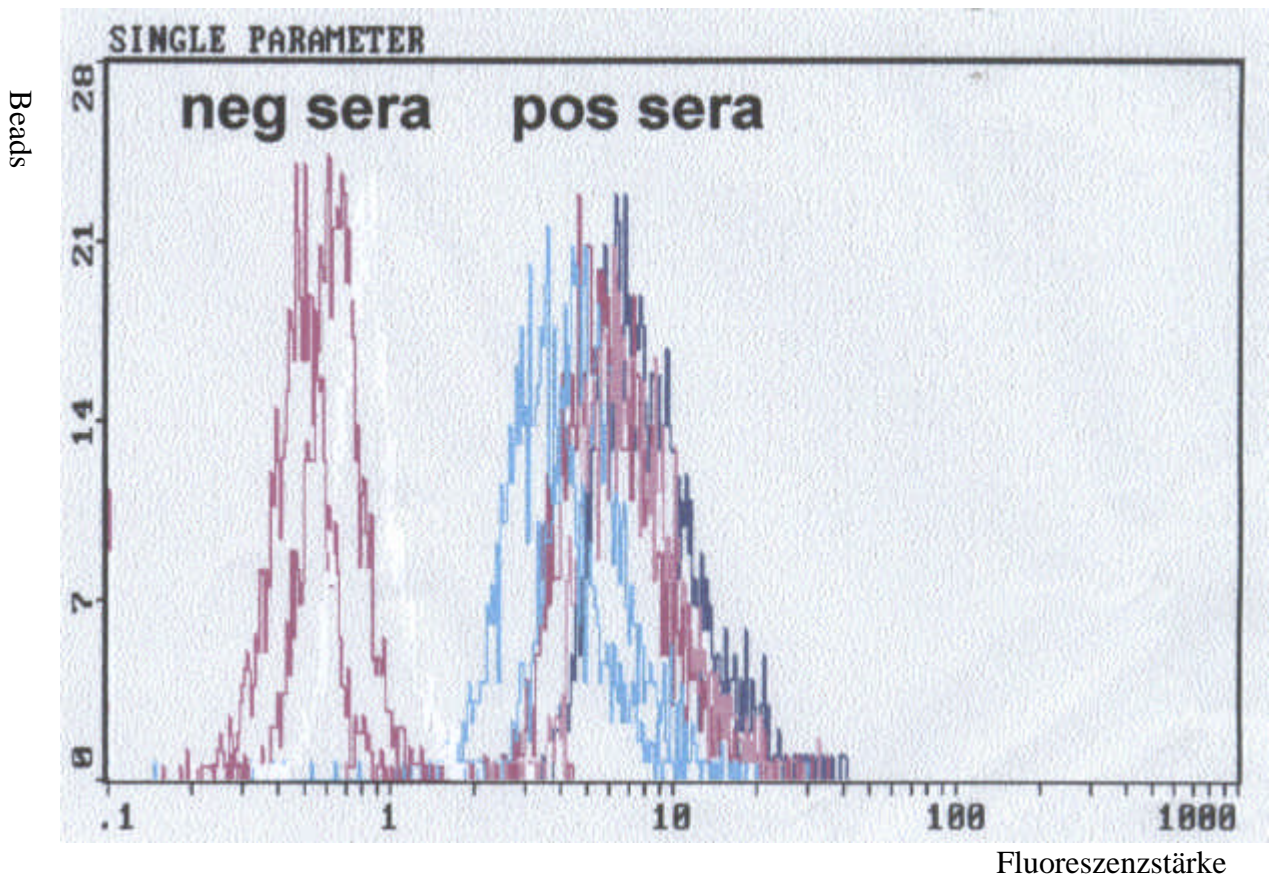
**Tab.6: Statistische Werte für die Durchflußzytometrie:**

	positive Seren	negative Seren
<b>Mittelwert</b>	7,005	0,525
<b>Median</b>	7,11	0,468
<b>Minimum</b>	3,65	0,19
<b>Maximim</b>	12	1,84
<b>Standardabw.</b>	1,985	0,258
<b>Varianz</b>	3,058	0,067
<b>Quartile 25%</b>	5,932	0,332
<b>75%</b>	8,38	0,626

Mittelwerte der relativen Fluoreszenzintensität der Positiv- und Negativseren und daraus berechnete statistische Größen

Negative Seren lagen alle unter 1,84 (Mittelwert 0,525), positive alle über 3,65 , bei einem Mittelwert von 7,0. Eine Unterscheidung war eindeutig möglich und wurde ausnahmslos richtig getroffen. Sensitivität und Spezifität beliefen sich somit auf 100%.

Dieser deutliche Ergebnisunterschied war auch graphisch zu sehen. In der Abbildung 6 wurden exemplarisch sechs zufällig ausgewählte Seren zur Verdeutlichung der Meßergebnisse computertechnisch übereinandergelegt.



**Abb.6: Overlay-Graphik zufällig ausgewählter Positiv- und Negativseren der DFZ:**

Die Maxima der Negativseren ( neg sera ) haben eine schwächere Fluoreszenz als die Positivseren ( pos sera ). Die Fluoreszenzstärke ist logarithmisch aufgetragen.

**Haltbarkeitsuntersuchung der Beads:**

Parallel zu den täglich frisch angesetzten Beads wurden über mehrere Tage „fertige / alte“ Beads mitgeführt. Diese Beads waren am 1.Versuchstag mit dem monoklonalen Antikörper und dem LPS inkubiert worden und wurden bis 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. An jedem folgenden Versuchstag wurden sie dann analog zu den normalen Probeseren mit der Serumverdünnung einer Positiv- und Negativ-Kontrolle inkubiert.

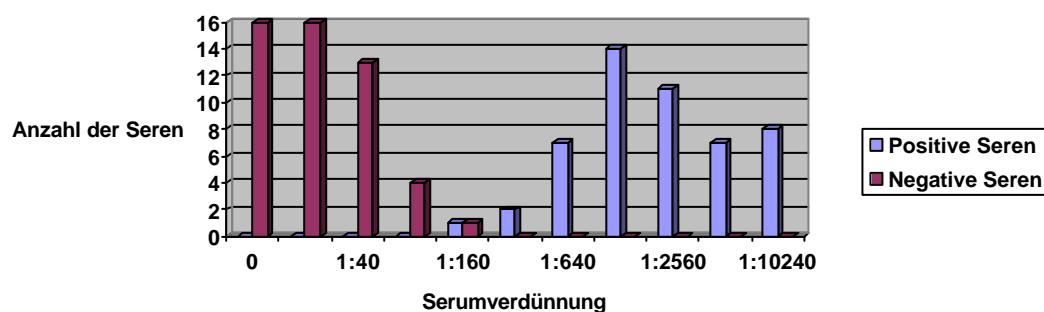
**Tab.7: Haltbarkeit LPS-beladener Beads:**

	1. Tag	2. Tag			5. Tag	6. Tag	7. Tag
pos. Kontrolle	6,18	6,0			5,59	6,71	6,32
neg. Kontrolle	0,699	0,716			0,585	0,748	0,752
PosKo-negKo	5,481	5,284			5,005	5,962	5,568

Stabilität schon mit LPS beladener Beads über 7 Tage. Aufgeführt ist die relative Fluoreszenzintensität der LPS-beladenen Beads an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen.

Die präparierten Beads erwiesen sich über den Zeitraum von 7 Tagen als stabil. Sie konnten problemlos verwendet werden und verkürzten die Versuchsdauer um 1,5 – 2 Stunden. Längere Zeiträume wurden für den Stabilitätsnachweis nicht untersucht. Die Differenz zwischen Positiv- und Negativkontrollen (PosKo-negKo) lag im normalen, methodisch bedingten Schwankungsbereich.

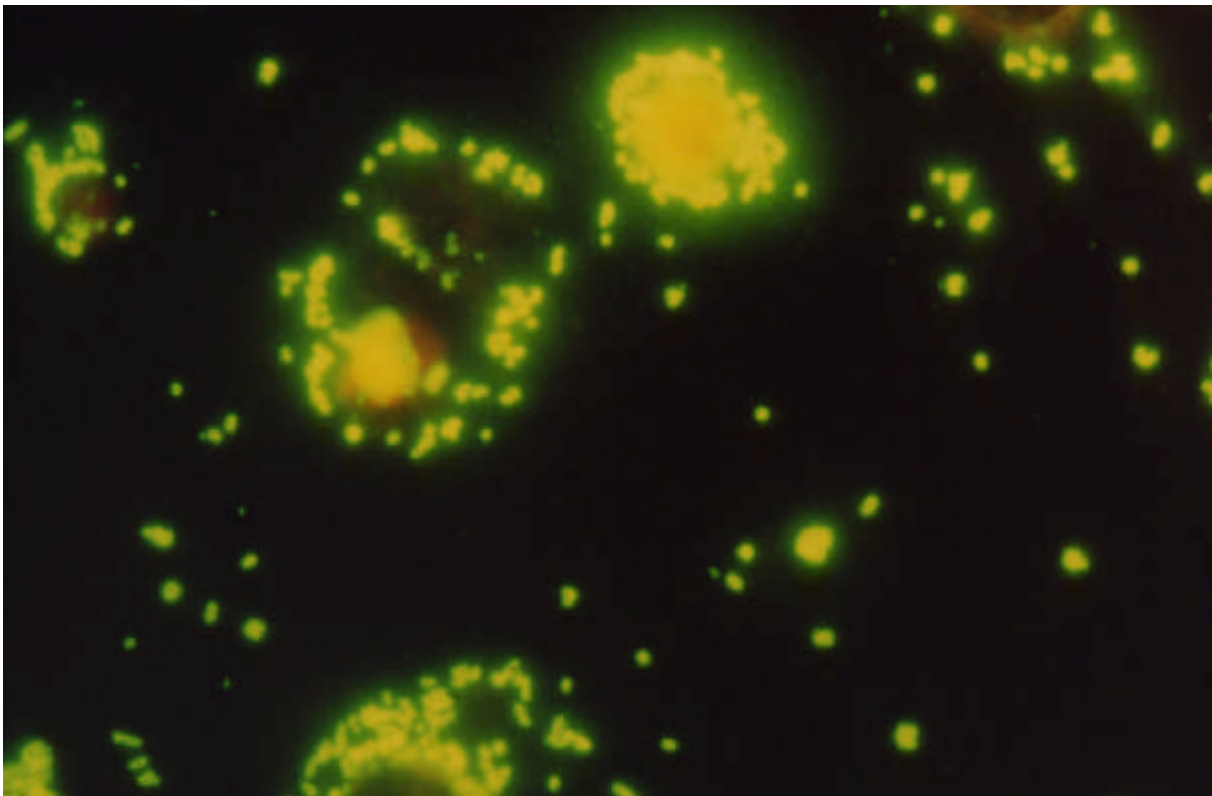
### 4.3 Immunfluoreszenz



**Abb.7: Titerverteilung bei der Immunfluoreszenz**

Neben der Titerbestimmung ist die Fluoreszenzstärke eines Serums das entscheidende Kriterium bei der Immunfluoreszenz (wie in Tab. 7 dargestellt). Auch wenn dieser Test bei der Auswertung unter dem Mikroskop einer gewissen Subjektivität unterliegt, so ist mit einem gewissen Maß an Übung eine sichere Einstufung der Fluoreszenzstärke und somit eine Bewertung des Testserums (positiv oder negativ) gut möglich.

Die Abbildung 8 zeigt das Bild eines positiven Serums mit dem typischen starken Fluoreszenzmuster.



**Abb.8: Fotobeispiel der Immunfluoreszenz ( positives Testserum ):**

*Francisella tularensis*-Bakteriensuspension (hier: infizierte Zellkultur) wurde auf Objektträger aufgetragen, mit Methanol fixiert, mit der Serumverdünnung inkubiert und gewaschen. Durch Zugabe FITC-markierter Anti-human-Antikörper wurden im Positivserum vorhandene und nun an das Antigen gebundene *Francisella tularensis*- Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff versehen.

Folgender Ausschnitt aus einer Bewertungstabelle soll das typische Bild der Fluoreszenz bei einem positiven und einem negativen Serum beispielhaft wiedergeben:

**Tab.8: Dokumentation eines Positiv- und Negativserums:**

Verdünnung	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
pos. Serum	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	++	+	+
neg. Serum	+	±	--	--	--	--	--	--	--	--

Beispiel des Fluoreszenzverhaltens eines positiven und negativen Serums im Immunfluoreszenztest

Alle positiven Seren zeigten bei den Verdünnungen 1:20 bis 1:160 – und meist noch weiter – starke (+++) bis sehr starke (++++) Fluoreszenz. Bei den negativen Seren war die Fluoreszenz in den anfänglichen, niedrigen Verdünnungen zwar meist vorhanden, aber immer nur schwach (+) und fiel dann rasch ganz ab (-).

Dies gilt bei der Betrachtung der Titer zu beachten, welche keine direkte Aussage über die Fluoreszenzstärke machen und ohne Miteinbezug der Fluoreszenzstärke in Einzelfällen zu einer Fehlinterpretation führen könnte! Abweichend von der üblichen Definition wurde der Titer bei der Immunfluoreszenz definiert als letzte Verdünnung mit der Fluoreszenzstärke (+) bzw. (++) .

**Tab.9 und 10: Titerverteilung bei unterschiedlicher Fluoreszenzstärke:**

Titer	Positive Seren		Negative Seren	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
1:20			16	32%
1:40			13	26%
1:80			4	8%
1:160	1	2%	1	2%
1:320	2	4%		
1:640	7	14%		
1:1280	14	28%		
1:2560	11	22%		
1:5120	7	14%		
1:10240	8	16%		
<b>keine Fluoreszenz</b>	0	0%	16	32%
<b>gesamt</b>	50	100%	50	100%

Prozentuale Verteilung der Titer bei der Fluoreszenzstärke (+)

Titer	Positive Seren		Negative Seren	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
1:20			3	6%
1:40			1	2%
1:80				
1:160	3	6%		
1:320	10	20%		
1:640	14	28%		
1:1280	11	22%		
1:2560	10	20%		
1:5120	1	2%		
1:10240	1	2%		
<b>keine Fluoreszenz</b>	0	0%	46	92%
<b>gesamt</b>	50	100%	50	100%

Prozentuale Verteilung der Titer bei der Fluoreszenzstärke (++)

Abhängig von der Definition des Titers erreichte die Immunfluoreszenz - würde das Fluoreszenzmuster über die gesamte Verdünnungsreihe vernachlässigt werden – somit eine Spezifität von 98% ( Titer = letzte Verd. mit + ) gegenüber 100% bei Festlegung des Titers bei (++) . Zeigt ein Serum in der Verdünnung 1:160 die Fluoreszenzstärke (++) oder mehr, so handelt es sich bei dieser Probe mit einer Wahrscheinlichkeit von 100% um ein Positivserum. Die Fluoreszenzstärke + entspricht der unspezifischen Fluoreszenz, welche auch Negativseren in niedrigen Serumverdünnungen (1:20) aufweisen können.

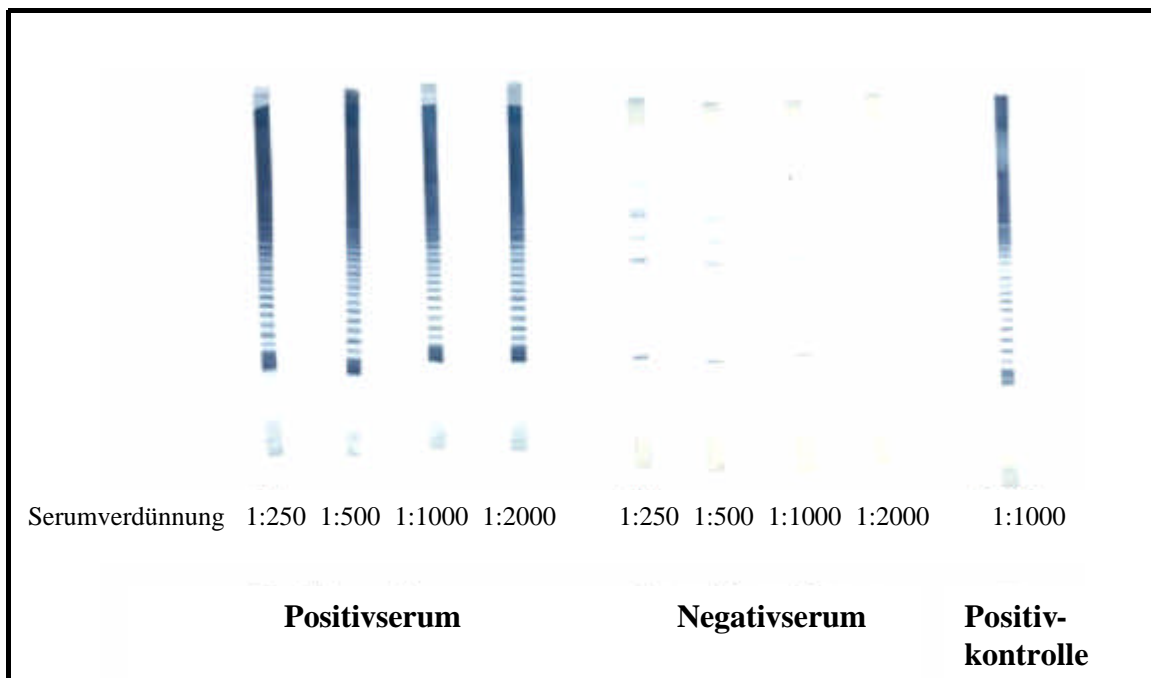
Ergo: Die Fluoreszenzintensität (++) wurde als Entscheidungskriterium verwendet.

Die Immunfluoreszenz erlaubte eine korrekte Zuordnung aller Seren ohne falsch positive oder falsch negative Ergebnisse. Die Positivseren hoben sich durch ihr Fluoreszenzmuster deutlich von den Negativseren ab.

Sensitivität und Spezifität beliefen sich auch bei diesem Test auf 100%

## 4.4 Westernblot

Wie in der Abbildung 9 anhand von 2 Beispielen dargestellt waren alle Testseren eindeutig auszuwerten.



**Abb.9: Fotobeispiel des Westernblot:**

Das Positivserum zeigt das Strickleiternmuster von *Francisella tularensis*. Beim Negativserum handelt es sich um unspezifische Banden.

Alle 50 negativen Seren stellten sich im Westernblot negativ dar. Alle 50 positiven Seren hatten einen Titer  $>1:2000$  und waren aufgrund des spezifischen Bandenmusters in allen Verdünnungen eindeutig als positiv auszuwerten.

Der Westernblot wie auch alle anderen von Hand abgelesenen Tests waren immer einer gewissen Subjektivität in der Bewertung ausgesetzt. Im Fall des Westernblot ist das charakteristische Bandenmuster nur bei Positivseren abzulesen gewesen, diese wiesen alle einen Titer  $>1:2000$  auf. Alle negativen Seren zeigten keine typischen Banden, nur vereinzelt waren unspezifische Bandenmuster vorhanden.

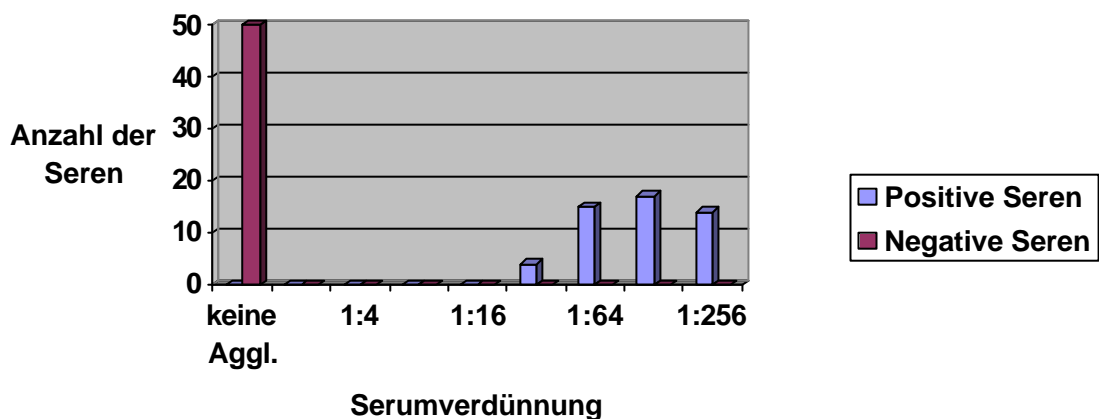
Es gab keine falsch positiven oder falsch negativen Ergebnisse. Somit betrug Sensitivität und Spezifität bei diesem Test 100%.



## 4.5 IMB-Agglutinationstest

Nach 24 Stunden wurden die Rundbodenplatten aus dem Brutschrank genommen und abgelesen.

Bei den 50 Negativproben fand über die gesamte Verdünnungsreihe keine Agglutination statt. Es zeigte sich ein stecknadelkopfgroßes Knöpfchen am Plattenboden. Bei allen Positivseren kam es zur Agglutination, was sich in Form einer Art dünnen Häutchens im Well zeigte. Dieses war in den höheren Verdünnung schwächer ausgebildet und trat - abhängig von der Antikörpermenge in dem jeweiligen Serum - ab einer gewissen Verdünnung dann gar nicht mehr auf. Der so bestimmte Titer bewegte sich bei allen positiven Seren zwischen 1:32 und 1:256.



**Abb.10: Titerverteilung beim IMB-Agglutinationstest**

Insgesamt wiesen 92% der Positivseren einen Titer = 1:64 auf.

**Tab.11 : Titerverteilung:**

<b>Titer</b>	<b>Positive Seren</b>		<b>Negative Seren</b>	
	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>
<b>1:2</b>	0		0	0%
<b>1:4</b>	0		0	0%
<b>1:8</b>	0		0	0%
<b>1:16</b>	0		0	0%
<b>1:32</b>	4	8%	0	0%
<b>1:64</b>	15	30%	0	0%
<b>1:128</b>	17	34%	0	0%
<b>1:256</b>	14	28%	0	0%
<b>keine Aggl.</b>	0	0%	50	100%
<b>gesamt</b>	50	100%	50	100%

Prozentuale Verteilung der Titer im IMB-Agglutinationstest

Eine Unterscheidung war ohne falsch positive oder falsch negative Testergebnisse in allen Fällen möglich.

Sensitivität und Spezifität betragen bei dem IMB-Agglutinationstest jeweils 100%.

## 4.6 DIFCO – Agglutinationstest

Der DIFCO *Francisella tularensis* Agglutinationstest für die Röhren- und die Objektträgermethode ist der einzige zugelassene und kommerziell erhältliche Test zum Nachweis von *Francisella tularensis*- Antikörpern.

### 1. Ansatz: Objektträgermethode

Zunächst einmal fiel auf, daß die in der Gebrauchsinformation angegebenen Endverdünnungen nicht mit den durch Serum- und Antigen-Mischung entstandenen Verdünnungen übereinstimmten .

**Tab.12: Beipackzettel des DIFCO-Agglutinationstests:**

Serum	5 µl	10 µl	20 µl	40 µl	80 µl
Antigen	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
errechnete Verdünnung	1:11	1:6	1:3,5	1:2,25	Antikörperüberschuß
<b>Im Beipackzettel angegebene Endverdünnung</b>	<b>1:320</b>	<b>1:160</b>	<b>1: 80</b>	<b>1:40</b>	<b>1:20</b>

Gegenüberstellung der auf dem Beipackzettel angegebenen und der errechneten Endverdünnungen für den DIFCO-Agglutinationstest

Trotzdem wurden Serum und Antigen mengenmäßig korrekt inkubiert, die Inkubationszeit sogar bis auf 24 Stunden verlängert.

### Testauswertung:

Nach 1 Minute konnte keine Agglutination festgestellt werden. Auch nach 5, 10, 30, 60 Minuten, bis 24 Stunden war keine eindeutige Agglutination zu sehen. Es konnte lediglich

eine Zunahme des Bodensatzes, verursacht durch die enthaltenen Farbstoffe (Kristallviolett 2ml/l und Brillantgrün 5ml/l), beobachtet werden.

## **2. Ansatz: Röhren-Methode**

Auch bei diesem Test war keine Auswertung möglich, da keine Agglutination eintrat.

## **3. Ansatz: Mikroversion Objektträger-Methode**

Es war keine Auswertung möglich. Mit zunehmender Verdünnung nahm der blaue Bodensatz zu.

## **4. Ansatz: Mikroversion Röhren-Methode**

Auch bei diesem Ansatz fand keine sichtbare Agglutination statt.

Nachdem die Humansen nicht agglutinierten wurde zur Kontrolle des Antigens der Ansatz mit positivem Kaninchenserum wiederholt. Auch hier kam es zu keiner Antigen-Antikörperreaktion. Ebenso bei Verwendung des von DIFCO vertriebenen Positivkontrollserums konnte keine Agglutination beobachtet werden.

## 4.7 Methodenvergleich

### ELISA

Die leichte Handhabung, die schnelle photometrische Auswertung und die hohe Sensitivität machen den ELISA zu einem optimalen Screening-Test. Eine Serumverdünnung von z.B. 1:640 ist zur Diagnostik einer Probe ausreichend, die Herstellung einer Verdünnungsreihe ist bei diesem Verfahren nicht notwendig. Aufgrund des großen Probendurchsatzes eignet sich der ELISA auch sehr gut für seroepidemiologische Studien.

### DFZ

Die Durchflußzytometrie ist eine in dieser Anwendung neue Methode zur Tularämie-Diagnostik. Ebenso sensitiv wie beim ELISA kann mit etwas größerem technischen Aufwand die Bestimmung von Tularämie-Antikörpern aus einer einzigen Serumverdünnung erfolgen. Der Probendurchsatz ist wegen des Mehr an Handarbeit geringer als bei dem ELISA, die Genauigkeit des Verfahrens jedoch ebenfalls sehr hoch.

Vergleichbare Zahlen von anderen Arbeitsgruppen gibt es nicht.

### IF

Die Immunfluoreszenz ist ein einfach zu handhabendes Verfahren zum Antikörpernachweis. Voraussetzung hierfür ist die Herstellung einer Verdünnungsreihe, denn nur damit kann das neben dem Titer entscheidende Fluoreszenzverhalten genau beurteilt werden. Während des Trocknens der aufgetragenen Bakteriensuspension kann es zur Klumpenbildung kommen. Die Größe des Objektträgerfeldes ermöglicht an ausreichend anderen Stellen stets eine einwandfrei Beurteilung der Fluoreszenzstärke eines Serums. Solche Klümpchen entstehen beim Herabsinken der Partikeln in dem trocknenden Tropfen und sind nicht zu verhindern. Ein Nachteil ist das Ausbleichen der Fluoreszenz und macht eine sofortige Auswertung der Immunfluoreszenz-Objektträger nötig.

## Westernblot

Die Blotstreifen sind über Wochen unter kühlen und trockenen Bedingungen haltbar. Die Testdurchführung ist relativ einfach, die Auswertung ist anhand des spezifischen Bandenmusters von *Francisella tularensis* eindeutig und theoretisch anhand einer einzigen Serumverdünnung möglich. Besser ist es jedoch eine Verdünnungsreihe, in welcher zugleich der Titer bestimmt werden kann, herzustellen. Der Westernblot setzte sich als Bestätigungstest in der Praxis durch.

## IMB-Agglutinationstest

Agglutinationstests sind arbeitsintensiv, da immer eine Verdünnungsreihe hergestellt werden muß. Ein Problem sind Kreuzreaktionen mit *Brucella ssp.*, *Proteus OX 19* und *Yersinia ssp.* (Mandell et al 1993), welche im Zweifelsfall stets durch weitere Tests ausgeschlossen werden müssen.

## DIFCO-Agglutinationstest

Im Beipackzettel weist der Hersteller DIFCO auf mögliche Kreuzreaktionen mit *Brucella*-Antigenen infolge der Antigenverwandtschaft mit *Francisella tularensis* hin, und erklärt, dass bei einem positiven Testausfall eine Infektion mit *Francisella tularensis* sehr wahrscheinlich sei. Zur endgültigen Diagnose müssten allerdings weitere anamnestische und klinische Befunde sowie zusätzliche Labordaten einbezogen werden. Im Gegensatz zum IMB-Agglutinationstest konnte dieser einzige, bis vor kurzem käufliche Test nicht als Screeningtest bestätigt werden. Anders als beim IMB-Agglutinationstest wird gerade bei dem DIFCO-Röhrchentest für jede Verdünnungsreihe eine große Menge an Bakteriensuspension benötigt.

So war mit allen im Institut für Mikrobiologie entwickelten Tests eine sichere Diagnostik möglich. ELISA, Westernblot, Immunfluoreszenz, Durchflußzyometrie und der IMB-Agglutinationstest erwiesen sich als signifikant, sie trennten alle sehr gut zwischen positiven und negativen Proben. In dem jeweils optimalen Verdünnungsbereich wiesen die Tests eine hohe Sensitivität und Spezifität auf:

**Tab.13: Sensitivität und Spezifität aller durchgeführten Tests:**

Test	Sensitivität	Spezifität
ELISA	100%	92,2%
DFZ	100%	100%
IF	100%	100%
WB	100%	100%
IMB-Agglutinationstest	100%	100%
DIFCO-Agglutinationstest	--	--

Für den Agglutinationstest der Firma DIFCO sind derartige Angaben nicht möglich, da in keinem der verschiedenen Versuchsansätze - trotz strikter Einhaltung der Gebrausanweisung - eine Agglutination beobachtet werden konnte.

## **5. Diskussion**

Die Tularämie ist eine seltene, potentiell tödliche Infektionskrankheit und war Bestandteil verschiedener B-Waffen-Programme in Russland (Alibek, 1999). Die Verwendung von *Francisella tularensis* als Kampfstoff kann deshalb heutzutage nicht ausgeschlossen werden.

In Deutschland erfolgten zuletzt vereinzelt alimentäre Infektionen. Europäische Naturherde führten z.B. in Spanien zu kleineren Tularämie-Ausbrüchen und im Kosovo kam es durch die schwierigen Nachkriegsbedingungen 2000/2001 begünstigt sogar zu einer Epidemie mit über 300 Erkrankten.

Der Antigennachweis (Kapitel 1.11) spielt seine größte Rolle sicherlich bei der Herdsuche und Verbreitungskontrolle anhand von Umwelt- und Tierproben. Die Kontamination dieser Proben mit anderen Mikroorganismen kann die Diagnostik erheblich erschweren. Sensitivität und Spezifität der oben erwähnten Tests sind z.T. noch immer sehr niedrig (Tab.14, S.65). Ein ausreichend sicheres Screening von Patienten mit Verdacht auf eine *Francisella tularensis*-Infektion mittels Antigen-Nachweis ist deshalb nicht gegeben.

Klinisch wird in Verdachtsfällen vor allem der serologische Antikörpernachweis verwendet.. Dieser ist ab 2 Wochen post infectionem möglich. Die Serodiagnostik ist hierfür ein schnelle und für das Laborpersonal relativ ungefährliche – v.a. im Vergleich zur Erregerkultivierung – Methode. Sie gibt mit der Bestimmung des Titers zudem Auskunft über den Verlauf der Infektion und die Abwehrlage des Patienten.

Verschiedene Studien, die sich auch mit der Sensitivität und Spezifität des *Francisella tularensis* – Antigen – und Antikörpernachweises beschäftigt haben sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.



**Tab.14: Publikationen zur Tularämiediagnostik:**

Nachweis von	Gruppe	Test	Sensitivität	Spezifität
Ag	<i>Sjöstedt et al., 1997</i>	Kultur (Ulkus)	25%	
Ag	<i>Junhui et al., 1996</i>	Kultur (Ulkus)	47,8%	
Ag	<i>Long et al., 1993</i>	Kultur (Blut)	13,2%	
Ag	<i>Junhui et al., 1996</i>	PCR	82,6%	
Ag	<i>Sjöstedt et al., 1997</i>	PCR	73%	
Ag	<i>Fulop et al., 1996</i>	PCR	88,9%	
Ag	<i>Grunow et al., 2000</i>	Tul4 spez.PCR capture ELISA immunochr. Assay	86,7% 100% 73,3%	
Ak	<i>Bevanger et al., 1988</i>	Mikroagglutination Ak-ELISA Ig A/G/M Ig separat je	90,9% 93% 97,5%	
Ak	<i>Sato et al., 1990</i>	Mikroagglutination 4 Tage post infectionem 5Tage post infectionem 7 Tage post infectionem	24% 50% 100%	
Ak	Nele Kischel <i>In dieser Arbeit beschriebene Daten</i>	ELISA Durchflußzytometrie Immunfluoreszenz Westernblot IMB-Agglutinationstest DIFCO-Agglutinationstest	100% 100% 100% 100% 100% -	92,2% 100% 100% 100% 100% -

Studien der letzten Jahre und die in ihnen ermittelte Sensitivität und Spezifität bei verschiedenen Methoden des *Francisella tularensis*- Antigen – und Antikörpernachweises

Es sind bisher wenig Daten zur Sensitivität und Spezifität des *Francisella tularensis*-Antikörper- Nachweises veröffentlicht worden. Die in der Tabelle 14 aufgeführten Autoren beschrieben für unterschiedliche Tests eine Sensitivität zwischen 24% und 100%. Angaben zur Spezifität waren den Artikeln leider nicht entnehmbar.

ELISA, Westernblot, Immunfluoreszenz, Durchflußzytometrie und der IMB-Agglutinationstest erwiesen sich als signifikant, sie trennten alle eindeutig zwischen positiven und negativen Proben. In dem jeweils optimalen Verdünnungsbereich wiesen die Tests eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität 100% (nur ELISA 92,2%) auf. Mit allen diesen Tests war für die Stichprobe von insgesamt 100 Humanseren eine optimale Diagnostik möglich.

Die Testung von 50 Positiv- und 50 Negativseren im Rahmen dieser Doktorarbeit hat Stichprobencharakter. Die oben angegebenen 100% Sensitivität bzw. Spezifität sind für eben

diese vorselektierte Stichprobe gültig und drücken nur aus, dass alle 100 Testseren richtig diagnostiziert wurden. Dem gegenüber sei erwähnt, dass die Arbeitsgruppe IMB über 6000 Seren aus einer Querschnittsuntersuchung bezogen auf ganz Deutschland untersucht hat und dabei für *Francisella tularensis* eine Prävalenz von 0,2% (im Westernblot wurden 15 von 6620 Seren positiv getestet) fand. Auf ein großes Kollektiv an Seren bezogen kann in der Praxis also zumindest von einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 99,8% ausgegangen werden. Zudem wurde durch die Kombination von Antikörper-ELISA (Screeningtest) und Westernblot (Bestätigungstest) die Wahrscheinlichkeit falsch positiver bzw. negativer Ergebnisse weiter minimiert.

Der DIFCO-Agglutinationstest konnte in dieser Arbeit als Screening-Test nicht bestätigt werden, da keine Agglutination eintrat. Seit den 60er Jahren ist dieser Test das einzige käufliche, für die Tularämie-Diagnostik beim Menschen zugelassene Testkit.

Die Seren wurden weit herunterverdünnt (bis 1:1280 Endverdünnung), um das Auftreten von Prozonen auszuschließen. Die Variation der Versuchsansätze – zumal die Gebrauchsinformation der Firma DIFCO für den Objektträgeragglutinationstest fehlerhaft ist – zeigte auch keinen Erfolg. Das Auftreten von Bodensatz ließ keine Auswertung zu. Daraufhin wurde mehrmals bei der Firma DIFCO bzw. mittlerweile BECTON DICKINSON GmbH in Heidelberg nachgefragt, dennoch reagierte die Firma bedauerlicherweise nach über einem Jahr des Versuchens nicht auf die Bitte um nähere Produktinformation. Offensichtlich wird dieses aus Detroit stammende Diagnostikum in Deutschland über BECTON DICKINSON nur vertrieben, jedoch auch die aus den USA versprochene Produktinformation kam nie an. Ebenso der Hinweis auf die fehlerhafte Verdünnungsangabe (Tab.12, S.61) im Beipackzettel führte zu keinerlei Handeln von Seiten der Firma DIFCO.

Nach mehrmaliger Testung verschiedener Chargen bleibt somit nur die Schlußfolgerung, dass dieser Test, der über 40 Jahre offenbar nicht konsequent weiterentwickelt worden ist, bei uns nicht funktionierte. Eine Möglichkeit für die Fehlleistung dieses Tests könnte u.U. darin bestehen, dass sich die Bakterien, die für dieses Assay verwendet werden, im Lauf der Zeit verändert haben, denn der IMB-Agglutinationstests, der mit dem aus dem Lebendvakzin-Stamm hergestellten Antigen durchgeführt wurden, erbrachte zufriedenstellende Resultate.

Ähnliche Erfahrungen mit dem DIFCO-Agglutinationstest (ca. 100 Tests/Monat) wurden auch am Zentralinstitut Koblenz der Bundeswehr gemacht (persönliche Mitteilung).

Ende 2001 wurde der Test aus der Produktpalette der Firma DIFCO genommen.

Der ELISA und der Westernblot wurden nach dem in Kapitel 3.3.1 bzw. 3.3.4 beschriebenen Schema bereits erfolgreich im Kosovo eingesetzt :

Im April 2000 wurden 2 Mitarbeiter des Instituts für Mikrobiologie auf Bitte der WHO in den Kosovo abgesandt, wo seit März 2000 in der Zivilbevölkerung mehr als 600 Verdachtsfälle von Tularämie registriert worden waren. In diesem Rahmen wurden 494 Seren auf Antikörper gegen *Francisella tularensis* mittels ELISA und Westernblot getestet. In 185 Fällen wurde eine Infektion bestätigt (42% der Verdachtsfälle, 24% Zufallsbefunde). Zusätzlich wurde bei 418 Seren der IMB-Agglutinationstest durchgeführt, wo sich 142 positive Seren fanden. Es wurden über 900 Proben mit dem ELISA ( Screening-Test ) und anschließend im Westernblot (Bestätigungstest) auf *Francisella tularensis*- Antikörper untersucht. Hierbei wurde durch Kombination der beiden Verfahren eine Spezifität und Sensitivität von 90% erreicht. Insgesamt wurde in 327 Fällen eine Infektion mit *Francisella tularensis* nachgewiesen (0-76 Jahre, m:f = 1:1 ) es handelte sich fast ausschließlich um die oro-pharyngeale Form. Aus Umweltproben und Proben betroffener Haushalte wurde kontaminiertes Trinkwasser und durch Nagetiere kontaminierte Lebensmittel als Infektionsquelle mittels Antigennachweis identifiziert. Die effiziente Diagnostik und Therapie konnte dazu beitragen die Epidemie relativ kurzfristig einzudämmen und mögliche Todesfällen zu verhindern.

Der vom IMB entwickelten Agglutinationstest wird derzeit für seroepidemiologische Studien der Tularämie im Kosovo von den Überwachungsbehörden vor Ort weiterhin verwendet.

### **Fazit:**

*Francisella tularensis* ist ein Bakterium, das - im Gegensatz zu der Mehrheit der Bakterien - nicht, auf den normalerweise im Kliniklabor verwendeten Agarplatten wächst. Mit den Standardmethoden der Mikrobiologie ist der Erregernachweis aus Ulcusabstrichen oder Blutkulturen kaum möglich. Zudem bedarf es bei der Kultivierung von *Francisella tularensis* spezieller Sicherheitsvorschriften, welche viele Labors nicht erfüllen. Die Methode der Wahl bei Verdacht auf eine Tularämie-Infektion ist der Nachweis von *Francisella tularensis*-Antikörpern.

Mit Ausnahme des DIFCO-Agglutinationstests erwiesen sich die getesteten Methoden zum serologischen Antikörpernachweis aus Humanseren als hoch sensitiv und spezifisch. Für die serologische Routinediagnostik am besten geeignet sind der **ELISA** und der **Westernblot**, da es sich um Methoden handelt, welche in den Labors größerer Kliniken zum Standard gehören. Mit ihrer Auswertung ist das Laborpersonal vertraut, es gibt wenig Fehlerquellen. Beide Tests sind hochsensitiv, die Extinktionsmessung im ELISA ist eindeutig, das Strickleitermuster von *Francisella tularensis* im Westernblot ist unverkennbar. Zudem bieten diese beiden Testverfahren die Möglichkeit sie in Form kompletter, vorbereiteter Kits zu herzustellen.

Die **Durchflußzytometrie** ist ebenfalls eine hochsensitive Methode zum Nachweis von *Francisella tularensis*-Antikörpern anhand von einer Serumverdünnung. Für die breite Routineanwendung besteht derzeit jedoch der Nachteil, daß nicht viele Labors ein Durchflußzytometer zur Verfügung haben.

Der **IMB-Agglutinationstest** bedarf einiger Erfahrung in der Auswertung und Kreuzreaktionen mit *Yersinien* und *Brucellen* können zu falsch positiven Ergebnissen führen. Es bedarf stets einer Verdünnungsreihe, die herzustellen arbeitsintensiv ist.

Der **DIFCO-Agglutinationstest** versagte als Screeningtest.

Aufgrund der im Lauf dieser Arbeit gewonnenen Erfahrungen läßt sich folgendes Schema bei Tularämie-Verdachtsfällen empfehlen:

Mit dem ELISA (Screeningtest) positiv getestete Seren werden im Westernblot (Bestätigungstest) nachuntersucht. Das Prinzip Screeningtest plus Bestätigungstest minimiert zudem die Gefahr von Verwechslungen, Pipettier- und Messfehlern. Die Kombination dieser beiden Tests ergab für die Stichprobe von 100 Humanseren eine Sensitivität von 100%. Diese Kombination serologischer Tests wurde bereits bei Ausbruchsuntersuchungen im Kosovo erfolgreich angewandt.

Für den *Francisella tularensis*-Antikörper-ELISA und den *Francisella tularensis*-Antikörper-Westernblot gibt es derzeit leider keine kommerziellen Anbieter. Bei Tularämieverdacht können Blut, Ulcusabstrich und anderes Probenmaterial an das Institut für Mikrobiologie der Sanitätsakademie München gesandt werden. Das IMB wurde 1999 durch das Robert-Koch-Institut zum Konsiliarlabor für Tularämie ernannt. Zudem gibt es dort Bestrebungen, den ELISA und Westernblot kommerziell herstellen zu lassen, um diese serodiagnostischen Tests weiteren Routinelabors zuführen zu können.

## 6. Zusammenfassung

Die Tularämie ist eine seltene, auf den Menschen übertragbare Zoonose. Natürliche Wirte wie Hase, Feld- und Wühlmaus, Haustiere (Hund, Katze, Hamster) und mehr als 50 Arthropoden können *Francisella tularensis* durch direkten Kontakt, aerogen, alimentär oder via Insektenstich übertragen. Besonders gefährdet sind Jäger und Land- und Forstwirte. Die Infektionsdosis liegt zwischen 10-50 Keimen (aerogen) und  $10^2 - 10^8$  Keimen (oral). Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist nicht beschrieben. Die laboridiagnostisch bestätigte Erkrankung an Tularämie ist gemäß Infektionsschutzgesetz § 6, 8 und 9 meldepflichtig. Eine Impfung gegen *Francisella tularensis* ist in Deutschland nicht zugelassen.

*Francisella tularensis* ist ein kleines, gramnegatives, fakultativ intrazelluläres und aerob wachsendes Bakterium, das zwischen dem 30. und 71. nördlichen Breitengrad endemisch vorkommt. Es gibt 4 Subspecies, von denen *ssp. tularensis* (Biovar A) die höchste Virulenz aufweist. Biovar A war während der Zeit des Kalten Krieges Bestandteil der B-Waffenprogramme in Ost und West.

Eine Infektion äußert sich nach einer Inkubationszeit von 3-5 Tagen mit grippeähnlichen Symptomen, regionalen Lymphknotenschwellungen und Ulcera an der Haut und den Schleimhäuten und setzt eine T- und B- zellabhängige Immunantwort in Gang. Eine frühzeitige antibiotische Therapie mit Streptomycin, Gentamicin oder Ciprofloxacin vermindert die Schwere der Erkrankung und beugt Komplikationen vor (Letalität 1-35%, abhängig von der Tularämieform).

Diagnostisch kann der direkte Erregernachweis mittels Kultur, PCR, Antigen-ELISA, oder immunochromatographischem Assay aus Blut, Stuhl, Urin, Sputum, Magensaft, Ulcusabstrich, Pleurapunktat und Gewebe- und Umweltproben erfolgen.

Der Nachweis spezifischer *Francisella tularensis*-Antikörper ist ab der zweiten Woche post infectionem im Agglutinationstest, im Antikörper-ELISA, im Westernblot in der DFZ und im Immunfluoreszenztest möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden je 50 zufällig ausgewählte Positiv- und Negativseren serologisch auf *Francisella tularensis*-Antikörper untersucht. Selbst entwickelte Tests wurden mit dem einzigen käuflichen Tularämie-Diagnostikum (DIFCO *Francisella tularensis*-Antigen für die Objektträger- und Röhrchenagglutination) statistisch verglichen. Als Antigen für die In-house-Tests wurde der Lebendvakzinstamm von *Francisella tularensis* (LVS, ATCC Nr. 29684) verwendet.

## Methoden und Ergebnisse:

**ELISA** 1:20 verdünntes LPS wurde an Polysorbplatten gebunden und mit Testseren in je 10 Verdünnungen inkubiert. Gebundene Francisella-tularensis-Antikörper wurden mittels POD- markierten Anti-human-Ig-Antikörpern quantitativ bestimmt.

Der kleinste p-Wert wurde für eine Serumverdünnung zwischen 1:320 bis 1:1280 errechnet. Der Cut off (Spezifität 92,2%) liegt abhängig von der gewählten Verdünnung zwischen 0,265 und 0,794. Der ELISA ist ein optimaler Screeningtest, weil er leicht zu handhaben, schnell und hochsensitiv ist und einen hohen Probendurchsatz ermöglicht.

**DFZ** LPS wurde an Goat-anti-Mouse Dynabeads gebunden, welche zuvor mit monoklonalen Francisella tularensis-Antikörpern beladen worden waren. An LPS gebundene humane Francisella tularensis-Antikörper wurden mit FITC-markiertem Anti-human-Immunglobulin gekennzeichnet und anschließend das ermittelte Lichtsignal im DFZ gemessen.

Die optimale Serumverdünnung für diesen Test betrug 1:25. Ebenso sensitiv wie der ELISA, erfordert diese Methode jedoch einen größeren Arbeitsaufwand und den Einsatz komplizierter und teurer technischer Geräte.

**IF** Auf Objektträgerfeldern fixierte Bakteriensuspension wurde mit je einem Tropfen Serum in der feuchten Kammer inkubiert und gebundene Francisella tularensis- Antikörper mit Hilfe von FITC-markierten Anti-human-Ig-Antikörpern sichtbar gemacht.

Der Test ist einfach zu handhaben, die benötigte Serum-Verdünnungsreihe (1:2 bis 1:256) ist arbeitsaufwendig. Die Definition des Titers in Abhängigkeit von der Fluoreszenzstärke ist sinnvoll. Für die Beurteilung einer Probe ist das in der Verdünnungsreihe abgelesene Fluoreszenzmuster entscheidend.

**Westernblot** Blotstreifen mit elektrophoretisch aufgetrenntem Bakterienlysat wurden mit den Seren inkubiert. Nach Zugabe von POD-markiertem Antihuman-Ig-Antikörpern und Zugabe von Substrat führte präzipitierendes Substrat zur Ausbildung der Banden.

Alle Positivseren wiesen einen Titer  $>1:2000$ , das *Francisella tularensis*-spezifische Strickleiternmuster war in allen Fällen eindeutig zu erkennen.

**IMB-Agglutinations-test** In die Wells einer Rundbodenplatte wurden 50  $\mu$ l Antigen (1:20 in 0,85% NaCl verdünnt) und 50  $\mu$ l Serumverdünnung (1:2 bis 1:256) pipettiert, gut gemischt und 20-24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die Herstellung der Serumverdünnungsreihe ist aufwendig. Positive Seren hatten einen Titer zwischen 1:32 und 1:256 (92% der Positivseren =1:64). Aufgrund der Antigenverwandschaft von *Francisella tularensis* mit Brucellen, Yersinien und Proteus OX19 sind mögliche Kreuzreaktionen zu beachten und auszuschließen.

**DIFCO-Agglutinations-test** Der Test für die Röhren- bzw. Objektträger-Agglutination wurde jeweils nach den Angaben des Herstellers und in einer Mikroversion durchgeführt. Hierzu wurden neben den üblichen 100 Testseren auch stark positive Seren aus dem Fundus des IMB verwendet.

Bei dem einzigen käuflichen Test war keine Agglutination auswertbar, trotz Ausschluß von Protonenbildung und Korrektur der fehlerhaften Verdünnungsangaben im Beipackzettel.

## **Fazit:**

Der Nachweis von *Francisella tularensis* ist mit der Routinediagnostik nicht möglich, da das Bakterium auf den Standardnährmedien nicht wächst. Bei Verdacht auf eine Francisellen-Infektion ist der serologische Antikörpernachweis die Methode der Wahl.

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tests – mit Ausnahme des DIFCO-Agglutinationstest – erwiesen sich als hoch sensitiv und spezifisch. Für die serologische Routinediagnostik sind der ELISA (Screeningtest) und Westernblot (Bestätigungstest) am besten geeignet. Die Diagnostik mittels Durchflußzytometrie oder IMB-Agglutinationstest ist mit gleicher Sensitivität und Spezifität auch möglich, in der Praxis aber aufgrund des höheren Arbeitsaufwands unterlegen.

## **7. Literaturverzeichnis**

Alibek, K.: Direktorium 15, Econ-Verlag, 1999

Berdal, B.P., Mehl, R., Haaheim, H., Loksa, M., Grunow, R., Burans, J., Morgan, C., Meyer, H.: Field detection of *Francisella tularensis*; *Scand. J. Infekt Dis.* 32 (2000) 287-291

Bevanger, L., Maeland, J. A., Naess, A. I.: Agglutinins and antibodies to *Francisella tularensis* outer membrane antigens in the early diagnosis of disease during an outbreak of tularemia; *J. Clin. Microbiol.* 26 (1988) 433-437

Burke, D. S.: Immunization against tularemia: Analysis of the effectiveness of live *Francisella tularensis* vaccine in prevention of laboratory-acquired Tularemia; *J. Infect. Diseases* 135 (1977) 55-60

Christenson, B.: An outbreak of tularemia in the northern part of Central Sweden, *Scand. J. Infect .*16 (1984) 285-290

Culkin, S .J., Rhinehart-Jones, T., Elkins, K. L. : A novel role for B-cells in early protective immunity to an intracellular pathogen, *Francisella tularensis* strain LVS; *J. Immun.* 158 (1997) 3277-3284

Dedie, K., Bockemühl, J., Kühn, H., Volkmer, K.-J., Weinke, T.: Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch; Ferdinand Enke Verlag Stuttgart , 1993, 363-375

Elkins, K., Leiby, D., Winegar, R., Nacy, C., Fortier, A.: Rapid generation of specific protective immunity to *Francisella tularensis* ; *Infect. Immun.* 11 (1992) 4571-4577

Epidemiologisches Bulletin, herausgegeben durch das Robert-Koch-Institut,  
5. Februar 2000 / Nr. 18

Evans, M.E., Gregory, D. W., Schaffner, W., McGee, Z. A.: Tularemia: A 30-year Experience with 88 cases; *Medicine* 64 (1985) 251-269

Flamm, H., Wiedermann, G.: Zur Methodik der serologischen Tularämie-Diagnostik,  
Hygiene-Institut der Universität Wien, Juli 1960

Forsmann, M., Sandström, G., Sjöstedt, A.: Analysis of the 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains an utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR; *Int. Syst. Bacteriol.* 44 (1994) 38-46

Francis, E.: Tularemia; *JAMA* 259 (1983) 3216-3223



- Fulop, M., Leslie, D., Titball, R. : A rapid, highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction ; *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54 (1996) 346-347
- Gelfand, M. S., Mehra, N., Simmons, B. P.: Tularemia and atypical lymphocytosis; *J. Tenn. Med. Assoc.* 8 (1989) 417-418
- Greco, D., Allegrini, G., Tizzi, T., Ninu, E., Lamanna, A., Luzi, S.: A waterborne tularemia outbreak; *Eur. J. Epidemiol.* 3 (1987) 35-38
- Grunow, R., Splettstößer, W., Hirsch, F. W., Kleemann, D., Finke, E. -J. : Differentialdiagnose der Tularämie; *Dtsch. Med. Wschr.* 126 (2001) 408-413
- Grunow, R., Splettstößer, W., Mc Donald, S., Otterbein, C., O'Brien, T., Morgan, C., Aldrich, J., Hofer, E., Finke, E.-J., Meyer, H.: Detection of *Francisella tularensis* in biological specimens using a capture-ELISA an immunochromatographic hand-held-assay, and a PCR; *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7 (2000) 86-90
- Grunow, R., Bosold, A., Schmitt, P., Splettstößer, W., Otterbein, C., Finke, E.-J.: New approaches for the laboratory diagnosis of *Francisella tularensis* and human serum antibodies using specific ELISAs and Westernblot; 51. Jahrestagung der Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 11. –14.10.1999, Regensburg, Deutschland; Abstracts 14 P8, 335
- Gurycova, D.: First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe; *European J. Epid.* 14 (1998) 797-802
- Hoel, T., Scheel, O., Nordahl, S. H. G., Sandvik, T.: Water- and airborne *Francisella tularensis* biovar *palaeartica* isolated from human blood; *J. Clin. Stud. Treat. Infect.* 19 (1991) 348-350
- Hofer, E., Schildorfer, H., Flatscher, J., Müller, M.: Zum Nachweis der Tularämie bei Feldhasen (*Lepus europaeus*) in Österreich; *Wien. Tierarztl. Monatsschr.* 84 (1997) 301-306
- Hollis, D. G., Weaver, R. E., Steigerwalt, A. G., Wenger, J. D., Moss, C. W., Brenner, D. J.: *Francisella philomiragia* comb. Nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup *novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease; *J. Clin. Microbiol.* 27 (1989) 1601-1608
- Hubalek, Z., Sixl, W., Halouzka, J.: *Francisella tularensis* in *Dermacentor reticulatus* ticks from the Czech Republic and Austria; *Wien. Klin. Wochenschr.* 24 (1998) 909-910
- Jellison, W. L.: Tularemia : Dr. Edward Francis and his first 23 isolates of *Francisella tularensis*; *J. Clin. Microbiol.* 34 (1995) 2894-2896
- Junhui, Z., Ruifu, Y., Jianchun, L., Songle, Z., Meiling, C., Fengxiang, C. : Detection of *Francisella tularensis* by the polymerase chain reaction; *J. Med. Microbiol.* 45 (1996) 477-82
- Jusatz, H. J.: Dritter Bericht über das Vordringen der Tularämie nach Mittel- und Westeuropa über den Zeitraum von 1950 bis 1960; *Zeitschrift für Hygiene* 148 (1961) 69-93

- Kaiser, A., Rieves, D., Price, A., Gelfand, M., Parrish, R., Decker, M., Evans, M.: Tularemia and rhabdomyolysis; JAMA 253 (1985) 241-243
- Karttunen, R., Surcel, H-M., Andersson, G., Ekre, H.-P., Herva, E. : Francisella tularensis-induced in vitro Gamma-Interferon , Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 2 responses appear within 2 weeks of tularemia vaccination in human beings; J. Clin. Microbiol. 29 (1991) 753-756
- Knothe, H.: Über die Tularämie in Schleswig-Holstein; Dtsch. Med. Wschr. 84 (1959) 906-909
- Koskela, P., Salminen, A.: Humoral immunity against Francisella tularensis after natural infection; J. Clin. Microbiol. 22 (1985) 973-979
- Kozuch, O., Gurykova, D., Lysy, J., Labuda, M : Mixed natural focus of tickborne encephalitis, tularemia and haemorrhagic fever with renal syndromes in West Slovakia, Acta virologica 39 (1995) 95-98
- Liles, W. C., Burger, R. J.: Tularemia from domestic cats; West. J. Med. 158 (1993) 619-622
- Long, G. W., Oprandy, J. J., Narayanan, R. B., Forties, A. H., Portier, K. R., Nacy, C. A. : Detection of Francisella tularensis in blood by PCR; J. Clin. Microbiol. 31 (1994) 152-154
- Mandell, G., Bennett, J.: Principles and Practice of Infectious disease, fourth edition, Churchill Livingstone, (1989) 2066
- Olsufjev, N. G., Meshcherykova, J. S.: Subspecific taxonomy of Francisella tularensis; Int. f. Syst. Bacteriol. 33 (1983) 872-874
- Penn, R. L., Kinasewitz, G. T.: Factors associated with a poor outcome in tularemia; Arch. Intern. Med. 147 (1987) 265-269
- Penn, R. L. : Francisella tularensis in Principles and Practice of Infectious Diseases, 4<sup>th</sup> Edition, Churchill Livingstone (1995) 2060-2068
- Pöhn, H. P., Rasch, G.: Statistik meldepflichtiger übertragbare Krankheiten, bga Schriften 5 (1993) 159-166
- Preston, R.: Annals of warfare; The bioweaponers; The New Yorker (1998) 52-65
- Robert Koch Institut: Epidemiologisches Bulletin: Tularämie: Fallbericht, Ausbruch im Kosovo und Übersicht ,18 (2000) 25-27
- Sandström. G.: The tularemia vaccine; J. Chem. Tech. Biotechnol. 59 (1994) 315-320
- Sato, T., Fujita, H., Ohara, Y. Homma, M. : Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia; J. Clin. Microbiol. 28 (1990) 2372-2374

Sjörstedt, A., Eriksson, U., Berglund, L., Tärnvik, A.: Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR; *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997) 1045-1048

Stenmark, S., Sunnemark, D., Bucht, A., Sjörstedt, A.: Rapid local expression of interleukin-2, tumor necrosis factor alpha and gamma interferon after cutaneous *Francisella tularensis* infection in tularemia-immune mice; *Infect. Immun.* 67 (1999) 1789-1797

Tärnvik, A., Eriksson, M., Sandström, G., Sjörstedt, A. : *Francisella tularensis* – a model for studies of the immune response to intracellular bacteria in man; *J. Clin. Immun.* 76 (1992) 349-354

Tigertt, W. D.: Soviet inable *Pasteuralla tularensis* vaccines; *Bacteriol. Rev.* 26 (1962) 354-373

## **8. Danksagung**

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. H. Wagner für die Vergabe des Themas.

Herzlichen Dank an Herrn PD Dr. R. Grunow für die freundliche und geduldige Unterstützung während der Arbeit.

Ich bedanke mich außerdem beim Institutsleiter Herrn Dr. E.-J. Finke , der mir die Mitarbeit im Institut für Mikrobiologie der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München ermöglicht hat.

Ganz besonderen Dank auch an die chemisch-technischen Assistenten Herrn Ulrich Hohenester und Herrn Frank Feist, die mir im Labor mit Rat und Tat zur Seite standen.