

**Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer**



**FSME-spezifische Immunität bei
FSME-geimpften Kindern und Jugendlichen mit JIA**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Kristin Robrade

aus **Zorneding**

Würzburg, November 2018

Referentin: Prof. Dr. Martina Prelog
Korreferent: Prof. Dr. Hans-Peter Tony
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2020

Die Promovendin ist Ärztin

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation „FSME-spezifische Immunität bei FSME-geimpften Kindern und Jugendlichen mit JIA“ selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Übernommene Inhalte wurden von mir eindeutig gekennzeichnet.

Ich erkläre außerdem, dass meine Dissertation weder vollständig noch teilweise schon einmal in einer anderen Fakultät mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erlangen, vorgelegt wurde.

Zorneding, den 08.11.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA)	1
1.1.1	Autoimmunität	1
1.1.2	Klassifikation der JIA.....	1
1.1.3	Pathogenese.....	4
1.1.4	Behandlung.....	5
1.1.5	Impfempfehlungen	7
1.2	Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME)	8
1.2.1	FSME-Impfung	9
1.2.2	FSME-Impfung bei Patienten mit Immunsuppression.....	10
1.3	Immunsystem	10
1.3.1	Erworbene Immunantwort.....	11
1.3.2	Angeborene Immunantwort.....	14
1.4	Immunität auf die FSME-Impfung bei älteren Personen und Patienten mit eingeschränktem Immunsystem	18
1.5	Rationale.....	18
2	Ziele.....	19
3	Material und Methoden	21
3.1	Material	21
3.1.1	Geräte	21
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	22
3.1.3	Reagenzien	23
3.1.4	Gebrauchsfertige Lösungen.....	24
3.1.5	Gebrauchsfertige Kits.....	24
3.2	Methoden.....	24
3.2.1	Ethikvotum.....	24

3.2.2	Probanden.....	24
3.2.2.1	JIA-Probanden.....	25
3.2.2.2	Kontroll-Probanden.....	25
3.2.3	Ficoll Dichtegradzentrifugation	26
3.2.3.1	Bestimmung der Zellzahl	27
3.2.3.2	Kyrokonservierung.....	27
3.2.4	IgG-anti-FSME-Konzentrations-ELISA	27
3.2.5	IgG-anti-FSME-Aviditäts-ELISA	28
3.2.6	Neutralisationstest	29
3.2.7	Interferon gamma – ELISPOT	30
3.2.7.1	Versuchsprotokoll	30
3.2.7.2	Vorversuche	32
3.2.8	Statistische Auswertungen	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Charakteristiken der Patienten- und Kontrollpopulation	39
4.2	IgG-anti-FSME-Konzentration	42
4.2.1	Vergleich der IgG-anti-FSME-Konzentration mit der Anzahl der FSME- Impfungen	44
4.2.2	Einfluss der Medikation auf die IgG-anti-FSME-Konzentration.....	47
4.3	IgG-anti-FSME-Avidität	49
4.3.1	Vergleich der IgG-anti-FSME-Avidität mit der Anzahl der FSME- Impfungen	51
4.3.2	Einfluss der Medikation auf die IgG-anti-FSME-Avidität	54
4.3.3	Korrelation von IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität.....	56
4.4	Neutralisationstest	58
4.4.1	Vergleich der Neutralisationstiter mit der Anzahl der FSME-Impfungen...	58
4.4.2	Einfluss der Medikation auf die Neutralisationstiter	61

4.4.3	Korrelation des Neutralisationstiters mit der IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität.....	63
4.5	Zelluläre Immunität.....	67
4.5.1	Interferon γ – ELISPOT	67
4.5.1.1	Aufteilung in Responder	68
4.5.1.2	Vergleich der zellulären Immunität mit der Anzahl der FSME-Impfungen	72
4.5.1.3	Einfluss der Medikation auf die zelluläre Immunität.....	75
4.6	Korrelation zwischen der zellulären und humoralen Immunität.....	77
4.6.1	INF γ -ELISPOT und IgG-anti-FSME-Konzentration.....	77
4.6.2	INF γ -ELISPOT und IgG-anti-FSME-Avidität.....	79
4.6.3	INF γ -ELISPOT und Neutralisationstiter.....	80
4.7	Zusammenfassung der FSME-spezifischen humoralen und zellulären Immunität	82
5	Diskussion	83
5.1	FSME-spezifische Immunität von FSME-geimpften Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen	83
5.2	Einfluss der Anzahl von FSME-Impfungen auf die FSME-spezifische Immunität	85
5.3	Einfluss der Medikation auf die FSME-spezifische Immunität	87
5.4	Technische Limitationen	89
5.4.1	Heterogenität der JIA Population.....	89
5.4.2	Methoden abhängige Limitationen.....	90
5.5	Ausblick	91
6	Zusammenfassung	92
7	Literaturverzeichnis.....	94
8	Anhang	I
8.1	Eigenleistung.....	I

8.2	Danksagung.....	I
8.3	Lebenslauf.....	II

Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Ak	Antikörper
AKP	Alkalische Phosphatase
AG	Antigen
ANA	Antinukleäre Antikörper
BSA	Bovine Serum Albumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CD	cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein
CSF	Colony stimulationg factor
gl	Deziliter
DMARDs	Disease modifying anti-rheumatic drugs
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTH	Ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-linked-immuno-Spot
FCS	Fetal calf serum
FSME	Frühsommer-Meningoencephalitis
g	Gramm
GK	Glukokortikoide
h	Stunde
Hib	Haemophilus influenza Typ B
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IgM/G	Immunglobulin M/G
IL	Interleukin
ILAR	International League of Associations for Rheumatology
INF	Interferon
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
max	Maximum
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
min	Minimum
Mio	Millionen
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MTX	Methotrexat
n	Number = Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate-buffered-saline
PHA	Phytohämagglutinin
RA	Rheumatoide Arthritis
RAI	Relativer Aviditätsindex
RF	Rheumafaktor

rpm	Rounds per minute
SFU	Spot forming units
STIKO	Ständige Impfkommission
TBE	Tick-borne encephalitis
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Receptor
Treg	Regulatorische T-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Tsd	Tausend
VIEU	Vienna International Units
VZV	Varizella-Zooster-Virus

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ILAR Klassifikation der JIA	2
Tabelle 2: Häufigkeitsverteilung, Erkrankungsalter und Geschlechterverteilung der verschiedenen Subtypen der JIA im Detail	4
Tabelle 3: Impfschemata der verschiedenen FSME-Impfstoffe.....	10
Tabelle 4: Verwendete Geräte.	21
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien.....	22
Tabelle 6: Verwendete Reagenzien.	23
Tabelle 7: Gebrauchsfertige Lösungen.....	24
Tabelle 8: Gebrauchsfertige Kits.....	24
Tabelle 9: INF γ -ELISPOT Ergebnisse des Vorversuchs 1.	34
Tabelle 10: INF γ -ELISPOT Ergebnisse des Vorversuchs 2.	36
Tabelle 11: INF γ -ELISPOT Ergebnisse des Vorversuchs 3.	37
Tabelle 12: Charakteristiken der Population.	41
Tabelle 13: Medikamentöse Therapie der Patienten mit JIA während der primären FSME-Impfung nach Diagnosestellung und während der Blutabnahme.	42
Tabelle 14: Kreuztabelle der IgG-anti-FSME-Konzentration und Anzahl der FSME-Impfungen bei Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen.	45
Tabelle 15: Kreuztabelle der IgG-anti-FSME-Avidität und Anzahl der FSME-Impfungen bei Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen.	52
Tabelle 16: Kreuztabelle der IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität.....	57
Tabelle 17: Kreuztabelle der Anti-IgG-FSME-Avidität und Anzahl der FSME-Impfungen bei Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen.	59
Tabelle 18: Kreuztabelle des FSME-Neutralisationstiter und der IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität bei FSME-geimpften Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen.....	64

Tabelle 19: Aufteilung der Patienten mit JIA und der Kontrollen in die verschiedenen Responder des INF γ -ELISPTs	69
Tabelle 20: Verteilung der Klassifikation, Medikation und der FSME-Impfungen bei den High, Low und Non Respondern des INF γ – ELISPOTs nach Stimulation mit Anti-FSME-Antigen.	71
Tabelle 21: Kreuztabelle der zellulären Immunität gemessen anhand eines INF γ -ELISPOTs und Anzahl der FSME-Impfungen bei Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen.....	73
Tabelle 22: Vergleich der IgG-anti-FSME-Konzentration mit den verschiedenen Responder Gruppen des INF γ -ELISPOTs.....	78
Tabelle 23: Vergleich der IgG-anti-FSME-Avidität mit den verschiedenen Responder Gruppen des INF γ -ELISPOTs.....	80
Tabelle 24: Vergleich des Neutralisationstiter mit den verschiedenen Responder Gruppen des INF γ -ELISPOTs.....	81
Tabelle 25: FSME-spezifische humorale und zelluläre Immunität bei FSME-geimpften Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen.....	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: JIA Behandlungs-Eskalationsschema.	7
Abbildung 2: Die drei verschiedenen Stufen des integrierten menschlichen Immunsystems.....	11
Abbildung 3: Die Rolle der B- und T-Zellen bei der spezifischen Immunantwort.....	13
Abbildung 4: Phasen der unspezifischen Immunantwort.....	16
Abbildung 5: Falcon Tube nach dem Zentrifugieren mit Aufteilung der verschiedenen Schichten des Blutes.....	26
Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der drei Triplets des INF γ -ELISPOTs.....	31
Abbildung 7: INF γ -ELISPOT Ergebnisse des Vorversuchs 1.	33
Abbildung 8: INF γ -ELISPOT Ergebnisse des Vorversuchs 2.	35
Abbildung 9: INF γ -ELISPOT Ergebnisse des Vorversuchs 3.	37
Abbildung 10: Verteilung der IgG-anti-FSME-Konzentration bei FSME-geimpften Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen.....	43
Abbildung 11: Verteilung der Werte in VIEU/ml der Anti-IgG-FSME-Konzentration, die unter 1000 VIEU/ml lagen, bei den Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen. ..	44
Abbildung 12: Vergleich der IgG-anti-FSME-Konzentration von Patienten mit JIA und gesunden Kindern bei verschiedener Anzahl von FSME-Impfungen.	46
Abbildung 13: IgG-anti-FSME-Konzentration der JIA Patienten bei verschiedenem Krankheitsstatus.	47
Abbildung 14: Einfluss von MTX auf die IgG-anti-FSME-Konzentration bei Patienten mit JIA.	48
Abbildung 15: Einfluss von TNF α -Inhibitoren auf die IgG-anti-FSME-Konzentration bei Patienten mit JIA.	49
Abbildung 16: Aufteilung der IgG-anti-FSME-Avidität bei FSME-geimpften Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen.....	50
Abbildung 17: Verteilung des relativen Aviditätsindex der IgG-anti-FSME-Avidität bei Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen.....	51

Abbildung 18: Vergleich der IgG-anti-FSME-Avidität von Patienten mit JIA und gesunden Kindern bei verschiedener Anzahl von FSME-Impfungen.	53
Abbildung 19: IgG-anti-FSME-Avidität der JIA Patienten bei verschiedenem Krankheitsstatus.	54
Abbildung 20: Einfluss von MTX auf die IgG-anti-FSME-Avidität bei Patienten mit JIA.	55
Abbildung 21: Einfluss von TNF α -Inhibitoren auf die IgG-anti-FSME-Avidität bei Patienten mit JIA.	56
Abbildung 22: Korrelation zwischen der IgG-anti-FSME-Avidität und –Konzentration.	57
Abbildung 23: Verteilung der FSME-Neutralisationstiter bei FSME-geimpften Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen.....	58
Abbildung 24: Vergleich der Neutralisationstiter von Patienten mit JIA und gesunden Kindern bei verschiedener Anzahl von FSME-Impfungen.	60
Abbildung 25: Neutralisationstiter der JIA Patienten bei verschiedenem Krankheitsstatus.	61
Abbildung 26: Einfluss von MTX auf die Neutralisationstiter bei Patienten mit JIA. ..	62
Abbildung 27: Einfluss von TNF α -Inhibitoren auf die Neutralisationstiter bei Patienten mit JIA.	63
Abbildung 28: Korrelation des FSME Neutralisationstiter mit der IgG-anti-FSME-Konzentration bei den Patienten mit JIA.....	65
Abbildung 29: Korrelation des FSME Neutralisationstiter mit der IgG-anti-FSME-Konzentration bei den gesunden Kontrollprobanden.	65
Abbildung 30: Korrelation des FSME Neutralisationstiter mit der IgG-anti-FSME-Avidität bei den Patienten mit JIA.	66
Abbildung 31: Korrelation des FSME Neutralisationstiter mit der IgG-anti-FSME-Avidität bei den gesunden Kontrollprobanden.	66
Abbildung 32: Übersicht über die Ergebnisse des INF γ -ELISPOTs nach Stimulation mit dem Anti-FSME-Antigen.	68
Abbildung 33: Ergebnisse des INF γ -ELISPOTs.	69

Abbildung 34: Verteilung der SFU/10 ⁶ PBMCs der High Responder nach Stimulierung mit dem Anti-FSME-Antigen.	70
Abbildung 35: Verteilung der SFU/10 ⁶ PBMCs der Low Responder nach Stimulierung mit dem Anti-FSME-Antigen.	70
Abbildung 36: Vergleich der zellulären Immunität von Patienten mit JIA und gesunden Kindern bei verschiedener Anzahl von FSME-Impfungen.	74
Abbildung 37: Die zelluläre Immunität der JIA Patienten bei verschiedenem Krankheitsstatus.	75
Abbildung 38: Einfluss von MTX auf die zelluläre Immunität bei Patienten mit JIA...	76
Abbildung 39: Einfluss von TNF α -Inhibitoren auf die zelluläre Immunität bei Patienten mit JIA.	77
Abbildung 40: Korrelation INF γ -ELISPOT und IgG-anti-FSME-Konzentration.	79
Abbildung 41: Korrelation INF γ -ELISPOT und IgG-anti-FSME-Avidität.	80
Abbildung 42: Korrelation INF γ -ELISPOT und Neutralisationstiter.	81

1 Einleitung

„Rheuma? Das hat doch der Opa, sagen Kinder, denken auch viele Eltern. [...] Und so stecken in dem Thema viele Missverständnisse: Eltern, Patienten, selbst manchen Ärzten ist Kinderrheuma unbekannt, obwohl immerhin 20 000, vielleicht sogar 25 000 Kinder in Deutschland betroffen sind“ (1).

1.1 Juvenile Idiopathische Arthritis (JIA)

Juvenile idiopathische Arthritis ist eine Autoimmunerkrankung im Kindesalter und ein Überbegriff für eine heterogene Gruppe von Subtypen mit destrukturierender Entzündung des Bewegungsapparates. Es handelt sich um die häufigste rheumatische chronische Erkrankung im Kindesalter (2).

Die JIA ist definiert als eine Gelenkentzündung für länger als sechs Wochen bei Kindern und Jugendlichen unter 16 Jahren. Andere Ursachen für die Arthritis müssen ausgeschlossen werden. Die Inzidenz in Deutschland wird mit 1500 Neuerkrankungen pro Jahr angegeben (3).

1.1.1 Autoimmunität

Unter Autoimmunität versteht man eine „gegen körpereigene antigene Substanzen (Autoantigene) gerichtete Immunreaktion [...] mit Bildung von Autoantikörpern“ (4 S. 210). Autoreaktive B-Zellen werden normalerweise im Knochenmark eliminiert und T-Lymphozyten, die körpereigene Zellen angreifen, werden im Thymus in die Apoptose geschickt oder in der Peripherie nicht stimuliert (5). Zu den Autoantikörpern zählen unter anderem der Rheumafaktor und die ANAs (Antinukleäre Antikörper). Verliert der Körper seine Selbsttoleranz, „reagiert das Immunsystem destruktiv auf körpereigene Strukturen“ (6 S. 137).

1.1.2 Klassifikation der JIA

Die International League of Associations for Rheumatology (ILAR) teilt die JIA in sieben verschiedene Subtypen ein. Tabelle 1 zeigt diese mit ihren jeweiligen Definitionen.

Subtyp	Definition
<u>Systemische Arthritis (Morbus Still)</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Arthritis: oft symmetrisch und polyarthritisch, nicht immer vorhanden - Hohes Fieber > 2 Wochen - Lachsfarbenes flüchtiges Exanthem - Lymphadenopathie - Hepato- oder/und Splenomegalie - <i>Labor</i>: Leukozytose, Thrombozytose, Anämie, sehr hohe BSG, erhöhtes CRP
<u>Oligoarthritis</u>	<ul style="list-style-type: none"> - asymmetrische Arthritis ≤ 4 Gelenke innerhalb der ersten 6 Monate (meist untere Extremität) - <u>persistierende Oligoarthritis</u>: nicht mehr als 4 Gelenke im Krankheitsverlauf betroffen - <u>erweiterte Oligoarthritis</u>: mehr als 4 Gelenke nach den ersten 6 Monaten der Krankheit betroffen - <i>Labor</i>: Akute-Phase-Proteine oft normwertig, ANAs in 70-80% positiv - <i>Ausschlusskriterien</i>: Psoriasis, Psoriasis in der Familie, eine HLA-B27-assoziierte Krankheit bei Verwandten 1. Grades, Rheumafaktor positiv, männlicher Patient > 6 Jahre alt
<u>Polyarthritis IgM RF positiv</u>	<ul style="list-style-type: none"> - symmetrische Polyarthritis (> 5 Gelenke betroffen) in den ersten 6 Krankheitsmonaten, typischerweise der kleinen Gelenke - vergleichbar mit der Rheumafaktor positiven rheumatoiden Arthritis im Erwachsenenalter - <i>Labor</i>: IgM Rheumafaktor mindestens 2x positiv (mit mehr als 3 Monaten Abstand)
<u>Polyarthritis IgM RF negativ</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Arthritis in > 5 Gelenken innerhalb der ersten 6 Monate ohne Nachweis des IgM Rheumafaktors - <u>Subtyp 1</u>: ähnlich Oligoarthritis mit polyarthritischem Krankheitsbeginn, asymmetrische Arthritis, ANAs positiv, erhöhtes Risiko von Iridozyklitis - <u>Subtyp 2</u>: ähnlich Rheumafaktor-negativer rheumatoider Arthritis im Erwachsenenalter, symmetrische Synovitis der großen und kleinen Gelenke, erhöhte BSG, ANAs negativ - <u>Subtyp 3 (trockene Synovitis)</u>: nur minimale Gelenkschwellung mit Steifigkeit und Flexionskontrakturen, meist normwertige BSG, oft schlechtes Ansprechen auf Therapie
<u>Enthesitis-assoziierte Arthritis</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Arthritis (50% ≤ 4 Gelenke im gesamten Krankheitsverlauf) der unteren Extremität mit Enthesitis meist des Ansatzes der Achillessehne am Calcaneus - oft Beteiligung der Hüftgelenke, evtl. auch Sakroilitis oder Beteiligung der Wirbelgelenke - HLA B27 positiv
<u>Psoriasis Arthritis</u>	<ul style="list-style-type: none"> - Arthritis und Psoriasis oder Arthritis und 2 der folgenden Kriterien: Psoriasis bei Verwandten 1. Grades, Daktylitis, Nagelveränderungen - <i>Ausschlusskriterium</i>: Enthesitis-assoziierte Arthritis
<u>Nicht-klassifizierte Arthritis</u>	Beinhaltet Patienten, die nicht die Kriterien einer Subgruppe erfüllen oder laut Kriterien in mehr als eine Subgruppe passen

Tabelle 1: ILAR Klassifikation der JIA (Abkürzungen: BSG=Blutsenkungsgeschwindigkeit, CRP=C-reaktives Protein, ANAs=antinukleäre Antikörper, RF=Rheumafaktor) [modifiziert nach (7)]

Die Ätiologie der verschiedenen Subklassen ist heterogen. Bei der systemischen Arthritis geht man von einem autoinflammatorischen Prozess aus (8), während die Enthesitis-assoziierte Arthritis und die Psoriasis Arthritis zu den HLA B27-assoziierten Spondyloarthropathien gehören (2). Ausserdem besteht beim Morbus Still eine Assoziation zum Makrophagenaktivierungssyndrom, welches eine schwerwiegende und potentiell letale Komplikation von rheumatologischen Erkrankungen ist (9).

Der IgM Rheumafaktor (RF) und die ANAs werden als serologische Marker bestimmt, um die Diagnose der JIA zu unterstützen.

Vor allem bei Patienten mit Oligoarthritis, aber auch mit Polyarthritis und der systemischen Form, sind die Titer der ANAs positiv. Diese sind einer der wichtigsten Risikofaktoren für eine Uveitis, welche besonders bei Patienten mit Oligoarthritis vorkommt (9). Es handelt sich meistens um eine asymptomatische Uveitis anterior, es kann aber auch eine akute symptomatische Uveitis bei HLA B27-positiven männlichen Patienten mit Psoriasis – oder Enthesitis-assoziiierter Arthritis sein. Oftmals wird eine Uveitis schon mehrere Jahre vor artikulären Symptomen diagnostiziert.

Bei etwa 2-12% der JIA-Patienten lässt sich ein IgM Rheumafaktor nachweisen. In den ILAR Kriterien ist das Vorhandensein des IgM Rheumafaktors ein Ausschlusskriterium von der Subgruppe Oligoarthritis und der systemischen Arthritis. Bei dem IgM RF handelt es sich um ein signifikantes Anzeichen für körperliche Behinderung, radiologische Schädigung und das Scheitern einer erfolgreichen Remission (9).

Die Oligoarthritis ist die häufigste Subgruppe der JIA und betrifft vorwiegend junge Mädchen (7), während die systemische Arthritis weder in einem bestimmten Alter auftritt noch eins der beiden Geschlechter bevorzugt betrifft. Die IgM Rheumafaktor-negative Polyarthritis ist die zweithäufigste Form der JIA und betrifft ebenfalls meistens weibliche Patientinnen. Das Erkrankungsalter hat bezüglich der Subtypen zwei verschiedene Häufigkeiten des Erkrankungsalters; Subtyp 1 tritt vorwiegend bei Kleinkindern auf, wobei Subtyp 2 meistens im Schulalter diagnostiziert wird. Enthesitis-assoziierte Arthritis betrifft vor allem Jungen im Alter über sechs Jahren.

In Tabelle 2 sind die Häufigkeitsverteilung sowie das Erkrankungsalter und die Geschlechterverteilung im Detail aufgezeigt.

	Häufigkeit	Erkrankungsalter	Geschlechterverteilung
Systemische Arthritis	4-17%	Durchgehend in der Kindheit	W = M
Oligoarthritis	27-56%	Frühe Kindheit; Gipfel bei 2-4 Jahren	W >>> M
Polyarthritis IgM RF +	2-7%	Späte Kindheit; Jugendalter	W >> M
Polyarthritis IgM RF -	11-28%	Zweiphasisch; früher Gipfel bei 2-4 Jahren, später Gipfel bei 6-12 Jahren	W >> M
Enthesitis-assoziierte Arthritis	3-11%	Späte Kindheit; Jugendalter	M >> W
Psoriasis Arthritis	2-11%	Zweiphasisch; früher Gipfel bei 2-4 Jahren, später Gipfel bei 9-11 Jahren	W > M
Nicht-klassifizierte Arthritis	11-21%

Tabelle 2: Häufigkeitsverteilung, Erkrankungsalter und Geschlechterverteilung der verschiedenen Subtypen der JIA im Detail (Abkürzungen: W=weiblich, M=männlich, RF=Rheumafaktor) [modifiziert nach (7)]

1.1.3 Pathogenese

Die Ursache und die Pathogenese der JIA sind nicht vollständig untersucht und verstanden, aber es scheint eine multifaktorielle Erkrankung mit genetischer Disposition und Umwelteinflüssen zu sein (7).

Infektionen und Impfungen wurden immer wieder als Trigger der Krankheit diskutiert, wurden aber dank verschiedener kontrollierter prospektiver Studien nicht bestätigt (2). Eine prospektive Studie zeigte keinen Einfluss auf die Krankheitsaktivität oder erhöhte Rückfallquote nach Impfung gegen Meningokokken Typ C (10) und eine retrospektive Studie zeigte keine Assoziation zwischen der Mumps-Masern-Röteln Impfung und einer Krankheitsexazerbation (11). Bei Patienten mit Polyarthritis sah man allerdings eine erhöhte proinflammatorische Immunantwort gegenüber Impfantigenen nach Impfung gegen Meningokokken Typ C (12).

Die Übereinstimmung und Ähnlichkeit des Phänotyps sowie des Verlaufs der Krankheit bei monozygoten Zwillingen unterstützt die These des genetischen Einflusses (13). Verschiedene Studien zeigen außerdem eine Assoziation zu Interleukin 10-regulierten Genen unabhängig vom Subtyp der JIA (2). Außerdem wurden einige Verbindungen zwischen humanen Leukozyten-Antigenen (HLA) und nicht-HLA Molekülen und einzelnen Subtypen der JIA, wie vor allem der Enthesitis-assoziierten Arthritis und der

Oligoarthritis, beschrieben (7). Unter den nicht-HLA Molekülen konnten PTPN22, MIF, SLC11A6, WISP3 und der Tumornekrosefaktor (TNF) α bestätigt werden (2).

Histopathologisch stellt sich die Gelenkentzündung als Infiltration der Synovia mit Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und dendritischen Zellen dar (9). Unter den T-Lymphozyten scheinen Th-1-Zellen zu dominieren, welche hohe Konzentrationen der Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 exprimieren (7). Insgesamt lassen sich verschiedene Subtypen der T-Zellpopulation in der Synovialflüssigkeit finden; wie zum Beispiel regulatorische T-Zellen (Tregs) und Th17-Zellen. Tregs befinden sich bei Patienten mit JIA außerdem in erhöhter Anzahl im peripheren Blut mit Hitzeschockproteinen (heat shock protein (hsp)60 und dnaJ) als bestdefinierte Antigene (2). Proben der Synovialflüssigkeit von Patienten mit verschiedenen Subtypen der JIA zeigten verschiedene CD4/CD8 Raten, was verschiedene pathogenetische Mechanismen der einzelnen Subgruppen der JIA nahelegt (14). Auch die Zytokine Interleukin (IL)-1, IL-6 und IL-18 wurden sowohl in den Seren als auch in der Synovialflüssigkeit in erhöhten Konzentrationen vorgefunden (15). Vor allem die systemische Arthritis gilt als Interleukin-6-vermittelte Erkrankung (16).

Insgesamt führt der entzündliche Prozess im Gelenk zur Hyperplasie der Gelenkkapsel und zur Bildung einer bindegewebigen Wucherung, welche Pannus genannt wird. Dieser greift den Knorpel an und es kommt zum Funktionsverlust des Gelenks mit Knorpel- und Knochenerosionen, vermittelt durch Abbauenzyme wie Metalloproteasen (17).

1.1.4 Behandlung

Eine kausale Therapie steht noch nicht zur Verfügung, aber es handelt sich um einen multidisziplinären Therapieansatz mit Physio- und Ergotherapie, medikamentöser Therapie und psychosozialer Unterstützung. Da es sich bei der JIA nicht um eine einzelne Krankheit handelt, variieren die Therapieansätze der unterschiedlichen Subtypen. Die Leitung und Koordination sollte möglichst von einem erfahrenen Kinderrheumatologen erfolgen.

Die Ziele der Therapie sind „eine rasche und effektive Entzündungsbehandlung mit entsprechender Schmerzbekämpfung, die Kontrolle der Grunderkrankung und gegebenenfalls die Remissionsinduktion, die Vermeidung von körperlicher Behinderung durch Gelenkkontrakturen, Gelenkdestruktion, Wachstumsstörung in den betroffenen Gelenken mit der Folge von Fehlstellungen, Erhalt der Sehkraft, Vermeidung der

Schädigung innerer Organe, Unterstützung bei psychosozialer Belastung der Patienten und der Familie, [sowie die] Gewährleistung einer weitgehend störungsfreien somatischen und psychosozialen Entwicklung der Kinder und Jugendlichen“ (18).

Die medikamentöse Therapie entspricht generell der der rheumatoiden Arthritis im Erwachsenenalter, allerdings sind nicht alle Medikamente im Kindesalter zugelassen.

Begonnen wird die Behandlung meistens mit nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR), es wird jedoch schon früh im Krankheitsverlauf mit einer aggressiveren Therapie eskaliert (9). Dabei handelt es sich meist um Glukokortikoide, welche systemisch oder intraartikulär gegeben werden können. Eine Langzeitbehandlung ist bei Kindern und Jugendlichen jedoch nicht empfohlen (19). Ebenfalls zu den Standardmedikamenten gehört das Methotrexat (MTX), welches zu der Gruppe der DMARDs (Disease modifying anti-rheumatic drugs) gehört. MTX ist als Folsäure-Antagonist ein Immunsuppressivum und muss am Anfang aufgrund einer Wirkverzögerung mit NSAR und/oder Glukokortikoiden kombiniert werden. Zu den DMARDs gehören außerdem Sulfasalazin, Azathioprin und Leflunomid und auch das Antirheumatikum Hydroxychloroquin wird selten angewendet.

Als weitere Eskalation stehen noch die Biologika zur Verfügung. Dies sind meist Antikörper, die gezielt in die immunologischen Prozesse eingreifen. Bisher sind diese nur als subkutane oder intravenöse Gabe verfügbar. Am häufigsten ist die Anwendung von Tumornekrosefaktor (TNF)- α -Inhibitoren wie Etanercept, Adalimumab und Infliximab, aber auch Interleukin (IL)-1-Blocker wie Anakinra und IL 6-Antagonisten wie Tozilizumab werden angewendet (19). Ebenfalls zur weiteren Eskalation, wenn das Ansprechen auf Biologika alleine nicht ausreichend ist, gibt es noch den Kostimulationsantagonist Abatacept (18).

Eine Übersicht über die Eskalationsschemata der JIA-Behandlung gibt Abbildung 1.

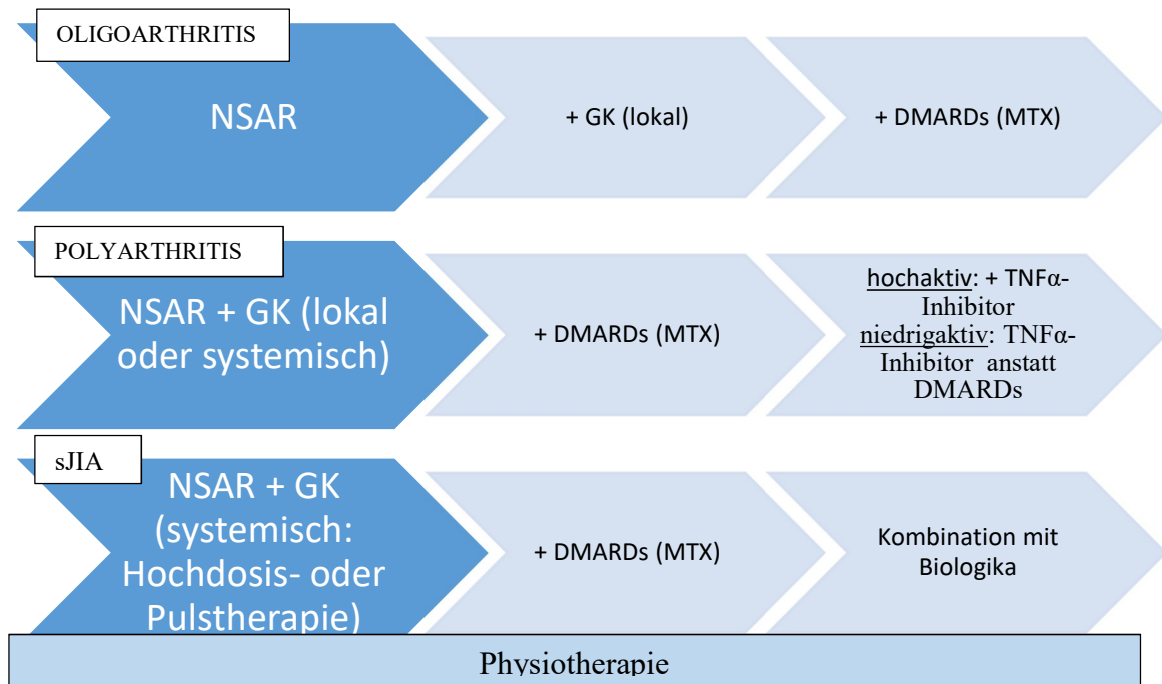


Abbildung 1: JIA Behandlungs-Eskalationsschema. Legende: +=Hinzufügen der Therapie (Abkürzungen: NSAR=nicht-steroidale Antirheumatika, GK=Glukokortikoide, DMARDs=disease modifying anti-rheumatic drugs, MTX=Methotrexat, TNF α =Tumornekrosefaktor α , sJIA=systemische JIA) [modifiziert nach (19)]

Als Ultima Ratio gibt es noch die autologe Stammzelltransplantation (20). Dies sollte jedoch aufgrund schwerer Nebenwirkungen bis hin zum Tod die letzte Therapiemöglichkeit bei therapieresistenten schweren Verläufen der JIA sein (19).

1.1.5 Impfempfehlungen

Generell gibt es noch keine sichere Empfehlung zur Immunisierung bei Patienten mit JIA, da die Datenlage zu gering ist (21). Kinder und Jugendliche mit JIA haben krankheitsbedingt ein etwa zweifach erhöhtes Risiko für Infektionen, welches sich bei immunsuppressiver Behandlung nochmals weiter erhöht (22). Etwa jedes dritte Kind mit juveniler idiopathischer Arthritis ist unzureichend geimpft (23). Zwar sind sie „genauso häufig grundimmunisiert wie die gleichaltrige Bevölkerung, aber sie erhalten Auffrischungsimpfungen nicht zeitgerecht“ (21). Aufgrund der zu niedrigen Anzahl der untersuchten Patienten gibt es noch keine Angaben zur Sicherheit von Impfungen bei Kindern und Jugendlichen mit JIA (21), das Ansprechen auf die Impfungen scheint aber ausreichend und es fanden sich keine „Hinweise auf relevante Aktivierung der Grunderkrankung“ (23). Trotzdem ist es nicht auszuschließen, dass vor allem unter Therapie nur eine eingeschränkte Impfantwort vorhanden ist (21).

Vorschläge für Impfempfehlungen für die European League Against Rheumatism (EULAR) beinhalten die standardmäßige Impfung gemäß der aktuellen STIKO-Empfehlungen (24). Totimpfstoffe können unabhängig von der Therapie geimpft werden, während Lebendimpfstoffe während der Behandlung mit Hochdosis-DMARDs, Hochdosis-Glukokortikoiden oder Biologika nicht geimpft werden sollten. Eine Varizella-Zoster-Virus (VZV)-Impfung sollte vor immunsuppressiver Therapie durchgeführt werden. Ebenfalls eine Impfung gegen Pneumokokken und Meningokokken und die jährliche Influenza-Impfung gehören zu den Impfempfehlungen für Patienten mit JIA (25) (26).

1.2 Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME)

Das Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME)-Virus gehört zu der Gruppe der Flaviviridae (27). Übertragen wird das Virus durch einen Zeckenstich, in Deutschland vor allem durch die Spezies *Ixodes ricinus*, aber auch durch den Verzehr von infizierter Ziegenmilch und durch die Auwaldzecke *Dermacentor reticulatis* (28).

Das Robert-Koch-Institut hat im April 2017 146 Landkreise in Deutschland zu Risikogebieten erklärt, wovon 56,8% in Bayern und 29,5% in Baden-Württemberg liegen (28). Insgesamt ist vor allem Süddeutschland betroffen.

Zecken kommen bevorzugt in lichten Wäldern oder Waldrändern sowie Flächen mit hohem Gras oder Büschen vor. Bei Befall sollte die Zecke sofort entfernt und die Wunde desinfiziert werden. Anders als bei Borrelien, welche erst 24 Stunden nach Kontakt auf den Menschen übertragen werden, „gelangen die FSME-Viren jedoch bereits beim Beginn des Blutsaugens von der Zecke auf den Menschen“ (28). Zecken kommen besonders von April bis November vor (29).

Die Krankheit ist meldepflichtig, verläuft typischerweise biphasisch und beginnt etwa eine Woche nach Infektion mit unspezifischen grippeähnlichen Symptomen. Diese erste Phase entspricht der Virämie (27). Nach einem fieberfreien Intervall von einigen Tagen kommt es zu spezifischen neurologischen Symptomen, einer Meningitis, Encephalitis, Myelitis oder einer Kombination deren. Insgesamt kam es im Jahr 2016 zu 348 FSME-Erkrankungen in Deutschland, wobei in 50% eine klinische Manifestation mit neurologischen Symptomen angegeben wurde (28). Allerdings verläuft der Großteil der Infektionen „asymptomatisch oder die zweite Krankheitsphase bleibt aus“ (28).

Nur etwa 5-10% der Fälle treten bei Kindern unter 15 Jahren auf und sowohl die Inzidenz als auch das Risiko einer schweren Erkrankung oder Komplikationen steigen ab einem Alter von 40 Jahren (28).

Eine spezifische Behandlung der FSME gibt es bisher nicht (30).

Um eine Infektion mit FSME zu diagnostizieren, werden spezifische virologische Analysen durchgeführt. Bei den meisten Patienten können FSME-spezifische-IgM oder –IgG-Antikörper mittels ELISA detektiert werden (27). Es müssen allerdings eine „durchgemachte FSME, Gelbfieber, Japanische Encephalitis, Dengue-, Westnilvirus- und Zika-Erkrankungen, als auch frühere Impfungen gegen FSME, Gelbfieber, Japanische Encephalitis bzw. Aufenthalte in den entsprechenden Endemiegebieten“ (28) erfasst werden, da diese durch eine Kreuzreaktivität zu falsch-positiven ELISA-Ergebnissen führen können.

1.2.1 FSME-Impfung

Nach den Richtlinien der Ständigen Impfkommission (STIKO) handelt es sich bei der FSME-Impfung um eine Indikationsimpfung. Dies bedeutet, dass die Impfung für Personen empfohlen ist, die in Risikogebieten leben, reisen oder beruflich gefährdet sind (29).

Die Impfung gegen FSME ist ein aktiver Totimpfstoff mit inaktivierten Erregern. Normalerweise sind drei Impfungen nötig, um einen vollen Impfschutz zu erreichen (30). Es gibt einen Impfstoff von den Firmen Baxter, das FSME-Immun®, und von Novartis, das Encepur®. Das Impfschema ist nur minimal unterschiedlich und in Tabelle 3 aufgezeigt. Die zweite Impfung wird nach 1-3 Monaten gegeben und die dritte Impfdosis nach etwa 12 Monaten. Auffrischimpfungen sind alle drei bis fünf Jahre vorgesehen (30):

	Standardimpfung	Schnellimpfung
FSME-Immun®		
1. Impfdosis = Tag 0		
2. Impfdosis	Nach 1-3 Monaten	Nach 14 Tagen
3. Impfdosis	Nach 5-12 Monaten	
4. Impfdosis (1. Booster)	Nach 3 Jahren	
Auffrischimpfungen alle:	3 Jahre (≥ 60 Jahre) – 5 Jahre (< 60 Jahre)	
Encepur®		
1. Impfdosis = Tag 0		
2. Impfdosis	Nach 1-3 Monaten	Nach 7 Tagen
3. Impfdosis	Nach 9-12 Monaten	Nach 21 Tagen
4. Impfdosis (1. Booster)	Nach 3 Jahren	Nach 12-18 Monaten
Auffrischimpfungen alle:	3 Jahre (≥ 50 Jahre) – 5 Jahre (< 50 Jahre)	

Tabelle 3: Impfschemata der verschiedenen FSME-Impfstoffe [modifiziert nach (30)]

Bisher ist noch kein Antikörper-Schwellenwert als Nachweis eines protektiven Impfschutzes definiert, aber in klinischen Studien mit FSME-Immun® 0,5ml wurde die „Seropositivität als ein ELISA-Titer von 126 VIEU/ml oder ein [Neutralisationstiter] von ≥ 10 “ (30) angegeben.

1.2.2 FSME-Impfung bei Patienten mit Immunsuppression

Aufgrund einer immunsuppressiven Therapie oder immunologischen Vorerkrankungen kann es zu einer unzureichenden oder ausbleibenden Immunantwort kommen. Zur Kontrolle des Impferfolgs ist deshalb eine Untersuchung auf FSME-spezifische Antikörper nach der zweiten Teilimpfung empfohlen (30).

1.3 Immunsystem

Da der Mensch täglich im Stoffaustausch mit der Umwelt steht, indem wir Organismen einatmen, schlucken oder durch die Haut- oder Schleimhautbarriere aufnehmen, besteht die Gefahr, dass es sich auch um pathogene Organismen handelt, die in den Körper gelangen. Das Immunsystem ist ein interaktives Netzwerk aus lymphatischen Organen, Zellen, humoralen Faktoren und Zytokinen. Die Funktion des Immunsystems ist es, pathogene und andere fremde Moleküle zu erkennen, diese abzuwehren und zu eliminieren. Dies macht sich vor allem bemerkbar, wenn das Immunsystem seine Funktion nicht mehr richtig ausführt: eine Überaktivität führt zu

Autoimmunerkrankungen und Allergien und eine Unteraktivität führt zu schweren Infektionen und Immundefekten wie zum Beispiel Tumoren (5).

Die Immunabwehr des Menschen wird typischerweise in drei Stufen eingeteilt: anatomische und physiologische Barrieren, die angeborene und die erworbene Immunität. Die angeborene und erworbene Immunantwort wird noch in einen zellulären Teil und in humorale Mechanismen eingeteilt, welche aus Proteinen und anderen Molekülen bestehen, die im Blut zirkulieren. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die drei verschiedenen Stufen des menschlichen Immunsystems.

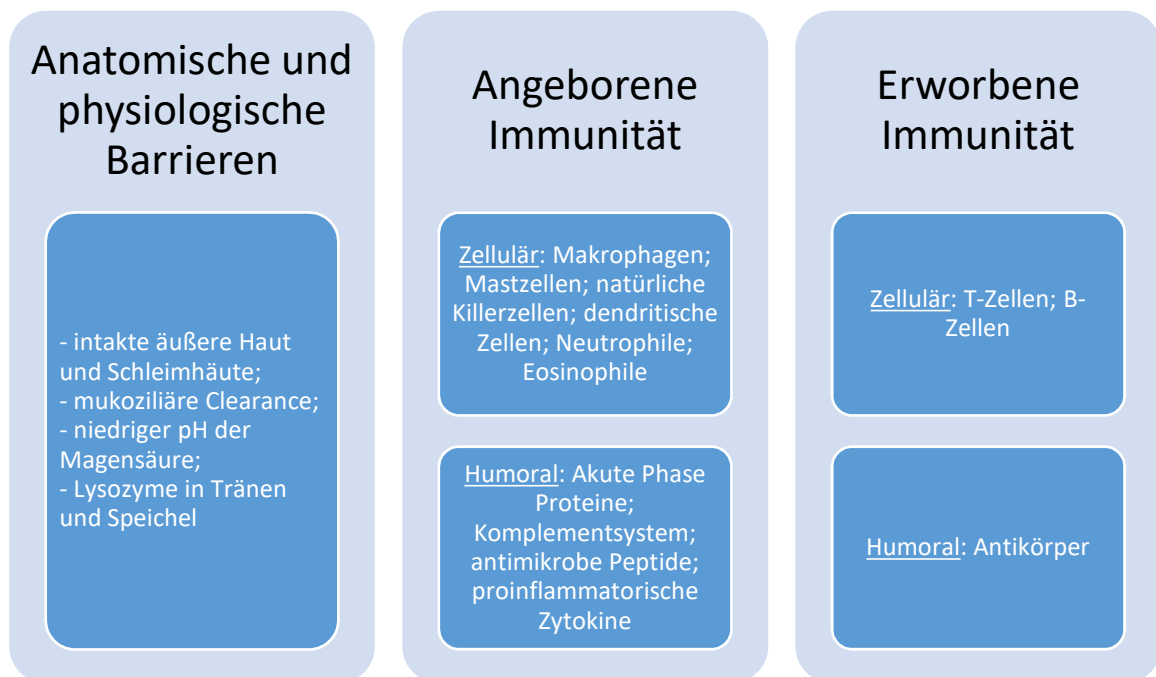


Abbildung 2: Die drei verschiedenen Stufen des integrierten menschlichen Immunsystems [modifiziert nach (31)]

1.3.1 Erworbene Immunantwort

Die erworbene Immunantwort wird auch spezifische oder adaptive Immunantwort genannt. Es handelt sich um ein streng reguliertes Zusammenspiel zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und den T- und B-Lymphozyten (32). Die Immunantwort ist gezielt gegen spezifische Antigene gerichtet, dauert aber mehrere Tage bis hin zu Wochen (5). Die Zellen können allerdings ein immunologisches Gedächtnis anlegen, woraufhin bei Zweitkontakt mit dem gleichen Antigen eines Mikroorganismus die Immunantwort sehr schnell funktioniert (32).

Insgesamt kann man sagen, dass T- und B-Zellen durch antigenspezifische Rezeptoren in zwei Schritten zu Effektorzellen differenzieren und eine Immunantwort einleiten. Zunächst wird ein Antigen von den antigenspezifischen T- oder B-Zellen erkannt, was

zum Priming, der Aktivierung und Differenzierung führt. Danach findet die Immunantwort der Effektorzellen statt, indem entweder die aktivierten T-Zellen das lymphatische Gewebe verlassen und zum Entzündungsherd wandern oder durch die Sekretion von Antikörpern von den aktivierten B-Zellen, den Plasmazellen (5). Abbildung 3 zeigt eine Übersicht über die Rolle der B- und T-Lymphozyten.

Die Differenzierung der T-Zellen findet im Thymus statt, wobei B-Lymphozyten im Knochenmark differenzieren. Jede T-Zelle hat einen spezifischen T-Zell-Rezeptor und wird durch Antigen-präsentierende Zellen aktiviert. Die T-Zelle erkennt das Antigen in Verbindung zusammen mit MHC Molekülen auf der Zelloberfläche (33). Man unterteilt die T-Zellen in CD4 (cluster of differentiation) positiv und CD8 positiv. CD4+ T-Lymphozyten erkennen nur Antigene, welche mit MHC II-Molekülen präsentiert werden, wobei CD8+ T-Lymphozyten MHC I-Moleküle brauchen (5).

Bei den CD8 positiven T-Zellen handelt es sich um zytotoxische T-Zellen. Durch Sekretion von zytotoxischen Faktoren kommt es zu einer direkten Zellyse. Somit werden Zellen eliminiert, welche Pathogene zusammen mit MHC I-Molekülen auf ihrer Oberfläche präsentierten. Hierbei handelt es sich meistens um Zellen, die von einem Virus befallen wurden oder um abnormale körpereigene Zellen, wie zum Beispiel tumoröse Zellen (33).

Bei den CD4+ T-Zellen unterscheidet man T-Helferzellen (Th-Zellen) und regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen). T-Helferzellen werden weiter in Th1-, Th2-, Th9-, Th17- und Th22-Zellen unterschieden (34 S. 228) (35) (36). Die Th1-Lymphozyten sind für eine zellulär-vermittelte Immunreaktion verantwortlich, indem sie $INF\gamma$ produzieren, welches Makrophagen und CD8+ T-Zellen stimuliert. Außerdem sezernieren sie IL2, welches eine T-Zellproliferation induziert. Th2-Zellen fördern eine humorale Immunantwort durch Interleukinsekretion (IL4, 5, 6, 10), welche eine Antikörperproduktion fördern (5). Die Th9-Lymphozyten produzieren IL9, welches eine wichtige Rolle in atopischen Krankheiten, autoimmunen Entzündungsprozessen und in der Proliferation und Differenzierung der Mastzellen und damit in allergischen Reaktionen spielt (35). Th17-Zellen sind durch die Produktion von hauptsächlich IL17 wichtig für die Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen, da sie neutrophile Granulozyten aktivieren (34 S. 239). Th22-Lymphozyten sind charakterisiert durch vor allem die Produktion von IL22, welches in verschiedenen rheumatologischen Erkrankungen erhöht und somit mit diesen Krankheiten assoziiert ist (36). Regulatorische T-Zellen hemmen immunologische und

inflammatorische Reaktionen, indem sie die Aktivität von Th-Zellen und den antigenpräsentierenden Zellen blockieren (33).

B-Zellen proliferieren und differenzieren nach Antigenkontakt zu Plasmazellen, welche große Mengen an Antikörpern produzieren. Die Aktivierung der B-Zellen findet entweder mithilfe von Th2-Zellen statt oder selten auch unabhängig von T-Zellen. Im zweiten Fall ist weder ein Antikörperswitch noch die Gedächtnisfunktion der B-Zellen möglich. Antikörper sind lösliche Proteine, die ein gegebenes Antigen oder Pathogen erkennen und eliminieren (33). Es gibt fünf verschiedene Isotypen von Antikörpern, als erstes wird immer das Immunglobulin (Ig) M vom Körper produziert. Später kann es zu einem Isotypenswitch kommen, wodurch die Plasmazellen dann auch Antikörper vom Typ IgG, IgA und IgE produzieren kann. IgM ist der größte Antikörper und findet sich intravaskulär, IgG ist der Hauptantikörper im Blut und dem Gewebe, IgA findet sich in Sekreten und IgE ist wichtig bei allergischen Reaktionen. Außerdem gibt es noch IgD, über den noch wenig bekannt ist (34 S. 263).

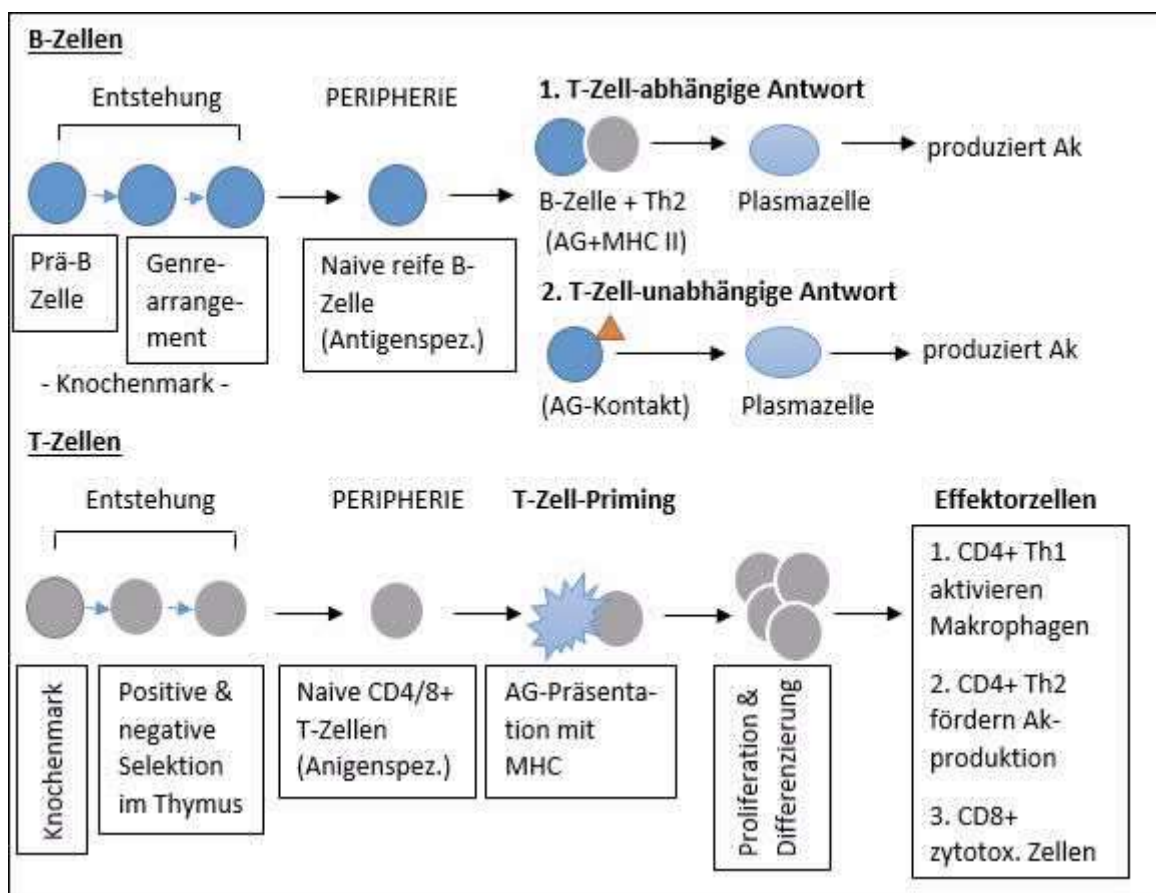


Abbildung 3: Die Rolle der B- und T-Zellen bei der spezifischen Immunantwort (Legende: B-Zelle = blauer Kreis, T-Zelle = grauer Kreis, Plasmazelle = blaues Oval, Antigen-präsentierende Zelle = blauer „Stern“, Antigen = orangenes Dreieck; Abkürzungen: MHC=major histocompatibility complex, AG=Antigen, Ak=Antikörper) [modifiziert nach (5)]

Außer zu Effektorzellen können B- und T-Zellen noch zu Gedächtniszellen differenzieren, welche für eine lange Zeit im menschlichen Körper überleben. Kontakt mit einem Antigen, welches entweder ein Pathogen oder eine Impfung sein kann, verändert also langfristig oder dauerhaft das zelluläre Repertoire. Das adaptive Immunsystem ist also in der Lage, bei Zweitkontakt eine schnellere und präzise Differenzierung von T- und B-Gedächtniszellen zu Effektorzellen zu erwirken und somit eine Produktion von hochqualitativen Antikörpern. Dies ist die Grundlage von Impfungen, welche per Definition ein immunologisches Gedächtnis auf ein bestimmtes Antigen zur Folge haben, indem eine Infektion imitiert wird und dem Körper Antigene ohne Pathogene zugeführt werden (33).

Als Marker stehen sowohl die Konzentrationen von Antikörpern als auch die Avidität zur Verfügung. Die Avidität ist die Antikörper-Bindungsfähigkeit und somit ein Marker für die Qualität der Antikörper, da sie als Langzeitparameter der Antikörper-Immunität durch klonale Selektion von hoch-affinen B-Zell-Klonen entsteht (37).

1.3.2 Angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunantwort wird auch unspezifische Immunantwort genannt und reagiert sehr schnell auf Pathogene. Innerhalb von Minuten nach Kontakt mit einem pathogenen Molekül kommt es zu einer protektiven inflammatorischen Immunantwort. Die physikalischen, chemischen und mikrobiologischen Barrieren werden ebenfalls zu der angeborenen Immunantwort gezählt (5).

Nach Überwindung dieser chemischen und physikalischen Barrieren, werden zunächst die Makrophagen aktiviert. Erkannt werden die Erreger durch Antigenbindung an Toll-like Rezeptoren (TLR), NOD-like Rezeptoren (31), Mannoserezeptoren, Komplement- und Fc-Rezeptoren (6 S. 93). Resultierend kommt es zur Phagozytose des mikrobiologischen Erregers, wodurch dieser eliminiert wird und Antigenfragmente auf der Oberfläche der Makrophagen präsentiert werden können. Außerdem sezernieren die Makrophagen Zytokine, wodurch weitere immunologische Zellen wie zum Beispiel die neutrophilen Granulozyten aktiviert werden und eine Entzündungsreaktion entsteht. Die Granulozyten sind ebenfalls zur Phagozytose fähig, vor allem von opsonierten Bakterien. Opsonierung mit spezifischen Antikörpern oder dem C3b Bestandteil des Komplementsystems vereinfacht und steigert die Effektivität der Phagozytose und Eliminierung der opsonierten Antigene (5).

Zur zellulären Komponente der unspezifischen Immunantwort zählen auch die eosinophilen Granulozyten, welche besonders bei Infektionen mit Parasiten aktiv werden und die Produktion von antigenspezifischen Antikörper der Klasse IgE induzieren. Außerdem setzen sie zytotoxische Proteine aus Granula frei (5). Basophile Granulozyten und Mastzellen kommen nur wenig im Körper vor, sind aber Bestandteil von schweren immunologischen Reaktionen wie dem Angioödem und der Anaphylaxie, indem sie hochaffine IgE-Rezeptoren besitzen und bei Bindung Histamin, Serotonin, vasoaktive Stoffe, Leukotriene und Prostaglandine freisetzen. Hierdurch kommt es zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität, Bronchokonstriktion und Inflammation (5).

Die natürlichen Killerzellen besitzen keine spezifischen Antigenrezeptoren, erkennen aber abnormale nicht körpereigene Zellen, indem sie MHC I – Rezeptoren besitzen. Der Major-Histocompatibility-Complex (MHC) besteht aus Glykoproteinen, die auf fast allen kernhaltigen Zellen vorkommen. Sind diese auf einer Zelle wie einem mikrobakteriellen Organismus nicht vorhanden, werden diese von den natürlichen Killerzellen erkannt und lysiert (5) (31). Weiterhin sezernieren die natürlichen Killerzellen Interferon γ , welches wiederum die Makrophagen aktiviert (38).

Dendritische Zellen können wie die Makrophagen Antigene binden und den Zellen der erworbenen Immunantwort präsentieren. Hierdurch stellen die dendritischen Zellen eine Verbindung zwischen dem unspezifischen und spezifischen Immunsystem her (31).

Die Phasen der unspezifischen Immunantwort sind in Abbildung 4 dargestellt.

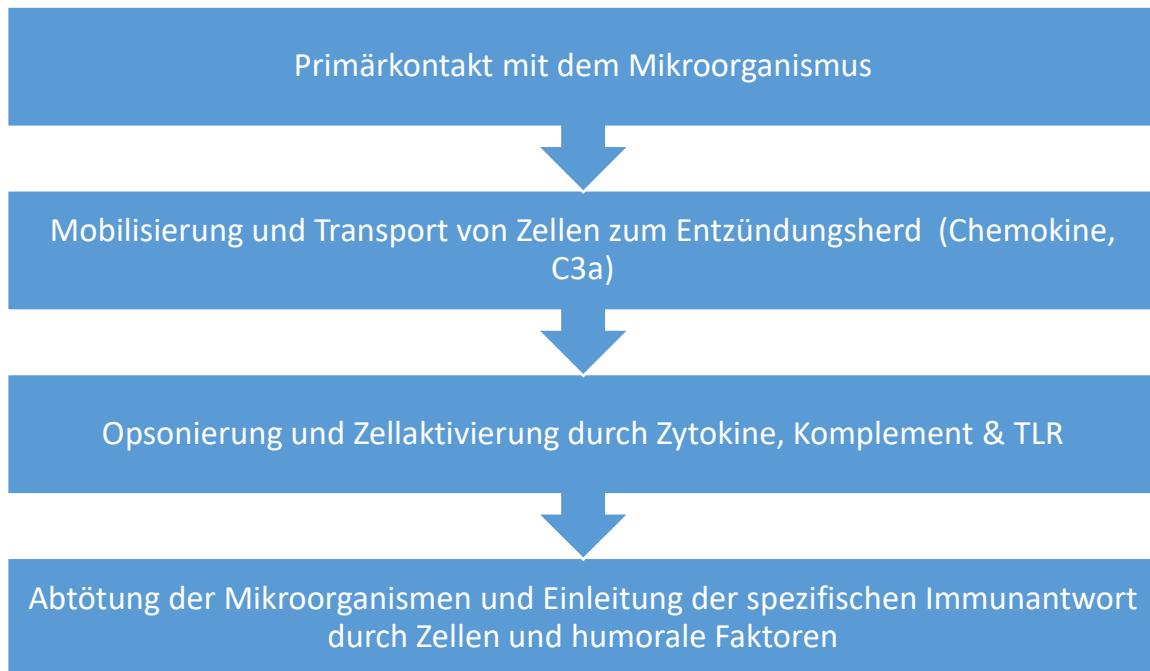


Abbildung 4: Phasen der unspezifischen Immunantwort (Abkürzungen: C3a=Komplementfaktor 3a; TLR=Toll-like Rezeptor) [modifiziert nach (5) (31) (6 S. 91-98)]

Das Akute-Phase-Protein C-reaktives Protein (CRP) bildet die erste Station der humoralen angeborenen Immunantwort. Es aktiviert das Komplementsystem, bindet an Fc Rezeptoren der Antikörper und fungiert als Opsonin für verschiedene Pathogene. Hierdurch kommt es zur Bildung von proinflammatorischen Zytokinen, welche die Entzündungsreaktion steigern (39).

Zytokine sind vom menschlichen Körper produzierte Eiweiße, die von fast allen Zellen sezerniert werden, um das eigene oder das Verhalten anderer Zellen zu verändern. Sie senden intrazelluläre Signale, indem sie an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche binden und können autokrin, parakrin oder endokrin wirken. Man unterscheidet Interleukine (IL), welche von Leukozyten gebildet werden, Chemokine, die die Chemotaxis vermitteln, colony-stimulating factors (CSF), welche die Proliferation von Stammzellen fördern, und Interferone (INF), die in die virale Replikation eingreifen (5). Chemokine werden von fast allen Zellen im menschlichen Körper produziert und Chemokinrezeptoren finden sich auf den Oberflächen aller Leukozyten. Mit den Adhäsionsmolekülen sind sie für die zelluläre Kommunikation verantwortlich. Sie vermitteln eine Zell-Migration und Aktivierung von Zellen, Phagozytose und Zytokinproduktion (5).

Aktivierte Makrophagen sezernieren IL-1, -6, -8, -12 und den Tumornekrosefaktor (TNF)- α . Interleukin- 1 und -6 führen zur Aktivierung von Endothelzellen, T- und B-

Lymphozyten, zur Auslösung von Fieber und synergistisch mit TNF- α zur Stimulation der Synthese von Akut-Phase-Proteinen. TNF- α steigert die Gefäßpermeabilität, stimuliert Thrombozyten, mobilisiert dendritische Zellen und aktiviert Neutrophile. Außerdem ist es für die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und damit für die Erleichterung der Extravasation von Leukozyten verantwortlich. Il-8 und -12 führen zur Chemotaxis und Degranulation von Neutrophilen und zur Stimulation von natürlichen Killerzellen (6 S. 96-7).

Interferone werden in Typ 1-Interferone (α und β) und Typ 2-Interferon (γ) eingeteilt. INF α und β wirken antiviral und antiproliferativ (5). Interferon γ wird von natürlichen Killerzellen und TH1-Zellen produziert (38). Es wirkt immunstimulierend, indem es Makrophagen aktiviert und die Produktion von MHC II auf antigenpräsentierenden Zellen erhöht (5).

Das Komplementsystem ist der Hauptbestandteil des angeborenen Immunsystems und gleichzeitig die Brücke zwischen der unspezifischen und spezifischen Immunantwort (40). Es handelt sich um mindestens 20 Glykoproteine im Serum, die in Kaskadensequenzen aktiviert werden (5). Aktiviert kann das Komplementsystem auf drei verschiedene Wege: dem klassischen, dem alternativen und dem Lektinweg. Klassisch nennt man die Aktivierung durch Antigen-Antikörper-Komplexe, der Lektinweg hängt mit dem Klassischen zusammen, indem die Aktivierung des Komplements durch Interaktion mit mannosebindendem Lektin eingeleitet wird. Der alternative Weg macht etwa 80% der Aktivierungen aus und wird durch verschiedene Reaktionen mit fremden Oberflächen getriggert. Alle drei Wege enden mit der Aktivierung des zentralen Komplementfaktors C3.

Zu den Funktionen gehört einerseits die Aufrechterhaltung der Homöostase durch Beseitigung von Immunkomplexen und apoptotischen Zellen und andererseits die Aktivierung von Immunzellen der angeborenen und erworbenen Immunantwort. Im Bereich der unspezifischen Immunantwort gehören außerdem Opsonisierung, Lyse von Pathogenen, Chemotaxis und Inflammation zu den Aufgaben des Komplementsystems. Auf der anderen Seite verbessert es die Antikörperantwort, fördert die T-Zell-Antwort und steigert das immunologische Gedächtnis der adaptiven Immunantwort (40).

1.4 Immunität auf die FSME-Impfung bei älteren Personen und Patienten mit eingeschränktem Immunsystem

Es gibt verschiedene Studien, die die Immunität auf die FSME-Impfung bei älteren Patienten sowie bei Patienten mit eingeschränktem Immunsystem untersuchen. Ältere gesunde Patienten zeigten geringere Antikörper-Konzentrationen nach der Impfung gegen FSME (41). Eine weitere Studie zeigt, dass Patienten mit Rheumatoider Arthritis und einer Therapie mit TNF α -Inhibitoren und/oder Methotrexat (MTX) im Vergleich zu einer gesunden Kontrollkohorte einen Monat nach beendeter Grundimmunisierung gegen FSME eine signifikant insuffiziente Antikörperproduktion haben (42).

Bei thymektomierten Kindern konnte ein verzögerter Anstieg der Antikörper-Konzentration nach der 2. Teilimpfung gegen FSME im Vergleich zu gesunden altersgleichen Kindern festgestellt werden, wobei die thymektomierten Kinder nach der 3. FSME-Teilimpfung eine vergleichbare Immunantwort zu den gesunden Kindern und damit eine gute Gedächtnis-Funktion des Immunsystems zeigten (43).

1.5 Rationale

Bisher gab es noch keine Untersuchung, ob die IgG-anti-FSME-Konzentration und – Avidität bei Patienten mit JIA und die von gleichaltrigen gesunden Kindern und Jugendlichen äquivalent sind. Ebenso sind keine Daten zur Korrelation der Antikörper zur zellulären Reaktivität der Patienten bekannt. In diesem Projekt sollte untersucht werden, wie die JIA-Patienten auf die FSME-Impfung ansprechen und ob diese Impfung bei den Patienten genauso immunogen ist wie bei gleichaltrigen gesunden Kindern und Jugendlichen.

2 Ziele

Impfungen sind bei Patienten mit JIA ausdrücklich auf Grund des erhöhten Infektionsrisikos durch die Grunderkrankung und der eventuellen immunsuppressiven Therapie empfohlen (24).

Abhängig von Lebensstilfaktoren und Aufenthalt in endemischen Regionen wird die FSME-Impfung allen Personen empfohlen. Es gibt jedoch Hinweise aus Vorstudien, dass die Antikörper-Antwort auf die FSME-Impfung bei älteren Personen, unter immunsuppressiver Therapie und bei Patienten mit einem eingeschränkten Immunsystem bei sonst sicherem Nebenwirkungsprofil verzögert ansteigt und rascher wieder absinkt (22) (41) (42) (43).

Bisher gab es noch keine Untersuchung, ob die IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität bei Patienten mit JIA und die von gleichaltrigen gesunden Kindern und Jugendlichen äquivalent sind. Ebenso sind keine Daten zur Korrelation der Antikörper zur zellulären Reaktivität der Patienten bekannt. Es sollte also entsprechend unserer Hypothese untersucht werden, ob die FSME-Impfung bei den JIA-Patienten genauso wirksam ist wie bei den gesunden Kontrollprobanden.

Primäres Ziel dieser Studie ist es daher, die IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität zu bestimmen und die Korrelation zwischen IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität zu berechnen. Als sekundäres Ziel wurden die Bestimmung der FSME-spezifischen zellulären Reaktivität und die Berechnung der Korrelation mit der IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität formuliert.

Die FSME-spezifische zelluläre Reaktivität soll durch IFN gamma produzierende Spot forming units/1.000.000 periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) ausgedrückt werden. Als statistische Nullhypothese soll für die Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis geprüft werden, dass keine Korrelation zwischen der FSME-spezifischen zellulären Reaktivität und der IgG-anti-FSME-Konzentration bzw. –Avidität besteht.

Geplant ist ein Wissenszuwachs durch Vergleich der IgG-Konzentration und der Avidität gegen neue Antigene bei JIA Patienten mit pharmakologisch-relevanter Immunsuppression oder Therapie mit Biologika. Als zusätzlicher Marker wird die zelluläre Reaktivität eingeführt, welche besonders durch die immunologische Dysbalance der T-Zellen durch die Krankheit selbst als auch der immunsuppressiven Therapie bei JIA Patienten beeinflusst wird. Als Zusatz-Nutzen ist eine Aussage über die Qualität der

Antikörper durch die Avidität und über die spezifische T-Zell-Antwort und damit indirekt ein Hinweis auf die Funktionstüchtigkeit des Immunsystems möglich.

3 Material und Methoden

Im Folgenden befinden sich eine Auflistung der verwendeten Materialien mit Herstellerangaben und eine detaillierte Beschreibung der durchgeführten experimentellen Methoden und statistischen Auswertungsmethoden.

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 4 aufgelistet.

	Handelsname	Hersteller	Lot.-Nummer
Brutschrank		Heraeus Holding GmbH, Hanau, D	
ImmunoCapture	ImmunoCapture 6.2	CTL, Bonn, D	
ImmunoSpot	ImmunoSpot	CTL, Bonn, D	
Kühlschrank	Comfort -20°C	Liebherr, Bulle, CH	
	Hera Freeze -80°C	Thermo Fisher, Langenselbold, D	1013508
Mikroskop	Mikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, D	
Pipetten	Reseach Plus 10µl	Eppendorf, Hamburg, D	492499Z
	Reseach Plus 100µl	Eppendorf, Hamburg, D	493057Z
	Reseach Plus 200µl	Eppendorf, Hamburg, D	379067Z
	Reseach Plus 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D	494528Z
	Multistep-Pipette	Eppendorf, Hamburg, D	
	Flaschendispenser, Typ Classic	Hartenstein GmbH, Würzburg, D	DF10
	Pipetboy	Integra Biosciences AG, Zizers, CH	156 401
Sterilbank	Gelaire BSB 6A	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, D	11031
Vortexer	RetschMixer	Hartenstein GmbH, Würzburg, D	
Waage		Denver Instrument, Bohemia, USA	
Wasserbad	GFL-1003 Wasserbad für Inkubationen und Inaktivierungen von Kulturen, 14 Liter	GFL, Burgwedel, Deutschland	10727841
Zählkammer	Zählkammer Neubauer improved doppelt, CE- Ausführung	Hartenstein GmbH, Würzburg, D	ZK 06
Zentrifugen	Rotanta/K	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D	
	Universal 32R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D	1610

Tabelle 4: Verwendete Geräte. (Abkürzungen: D=Deutschland, CH=Schweiz)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5 zeigt die Materialien im Detail, welche für die Versuche verwendet wurden.

	Handelsname	Hersteller	Lot.-Nummer
96-Well-Platte	96-Well Filtration Plate, Multiscreen HTS IP Sterile Plate	Millipore, Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, D	MSIPS4W10
	96-Well Filtration Plate, Multiscreen-HA Sterile Plate	Millipore, Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, D	MAHA S45 10
Cyro Tube	CYRO.S mit Schraubverschluss 1ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D	123 278
Einmalpipette	Cellstar 10ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D	607 180
Einmalspritze	Injekt® Solo 5ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland	460 6051
Eppendorf Tube	Micro tube PP 1,5ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D	72.692.005
	Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D	72.690.001
Falcon Tubes	Cellstar 15ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D	188 271
	Cellstar 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D	227 261
Filter	Filter 0,45 µm, 7 bar max.	Schleicher & Schuell, Altmann Analytik GmbH & Co. KG, München, D	CX1347-1
Frosty Box	Cyro Freezing Container	Nalgene, Rochester, USA	51000001
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D	70.762
	Pipettenspitzen 20 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D	70.1116
	Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D	70.760.002
	Combitips advanced® 5ml	Eppendorf, Hamburg, D	0030089662

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien. (Abkürzungen: D=Deutschland)

3.1.3 Reagenzien

Die Reagenzien, die bei den verschiedenen Versuchen verwendet wurden, sind in Tabelle 6 aufgelistet.

	Handelsname	Hersteller	Lot.-Nummer
BSA	Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D	A2058-1G
Destilliertes Wasser	Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen, Deutschland	
DMSO	Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D	A99.4.2
Ethanol 96%	Ethanol 96%	Otto Fischar GmbH % Co. KG, Saarbrücken, D	27688
FCS	Fetales Kälberserum	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland	S0615
Ficoll	FicoLite-H (Human)	LINARIS Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, D	GTF1511YK
FSME Antigen	FSME-Ticovac like	Baxter Healthcare GmbH, Wien, AU (ab 1.12.2014: Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, D)	
Interferon γ - Antikörper	Monoclonal antibody to Human Interferon- γ (mAb 1-D1K)	Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden	3420-3-1000
Interferon γ - Biotinantikörper	Monoclonal antibody to Human Interferon- γ (Biotinylated) (mAB 7-B6-1-Biotin)	Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden	3420-6-1000
NaCl 0,9%	NaCl 0,9%	Fresenius SE & Co. KGaA, Bad Homburg, D	00809061
PBS	PBS (phosphate buffered saline) tablets	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D	18912-014
PenStrep	Penicillin Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D	P4458
PHA	Phytohemagglutinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D	
RPMI	RPMI 1640	Lonza Group Ltd, Walkersville, USA	BE12-702F
Streptavidin	AKP Streptavidin	BioLegend, Fell, Deutschland	405211
Substrat	BCIP/NBT Plus	Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden	3650
Trypanblau	Trypanblau (C.I. 23850)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, D	111732
X Vivo	X Vivo	Lonza Group Ltd, Walkersville, USA	BE04-418Q

Tabelle 6: Verwendete Reagenzien. (Abkürzungen: D=Deutschland, FSME=Frühsommer-Meningoencephalitis, NaCl=Natriumchlorid)

3.1.4 Gebrauchsfertige Lösungen

In Tabelle 7 ist die Zusammensetzung von gebrauchten Lösungen aufgezeigt.

Nährmedium	RPMI + 1% PenStrep
Ficoll-Nährmedium	RPMI + 1% PenStrep + 10% FCS
ELISPOT-Nährmedium	RPMI + 1% PenStrep + 7% FCS
Erythrozyten-Lysis Puffer	8,26g Ammoniumchlorid + 1g Kaliumbicharbonat + 0,037g EDTA in 1l Aqua dest.
Einfrriermedium	RPMI + 20% FCS + 10% DMSO

Tabelle 7: Gebrauchsfertige Lösungen. (Abkürzungen: PenStrep=Penicillin Streptomycin, FCS=Fetales Kälberserum, EDTA=Ethylendiamintetraessigsäure, Aqua dest.= destilliertes Wasser, DMSO=Dimethylsulfoxid)

3.1.5 Gebrauchsfertige Kits

Zur Bestimmung der IgG-anti-FSME-Avidität wurde das in Tabelle 8 aufgelistete vom Hersteller bereits zusammengestellte Set verwendet.

	Handelsname	Hersteller	Lot.-Nummer
IgG-anti-FSME-Aviditäts-ELISA	Testsystem: TBE-virus avidity determination	EuroImmun AG, Lübeck, Deutschland	EI 2661-9601-1 G

Tabelle 8: Gebrauchsfertige Kits

3.2 Methoden

3.2.1 Ethikvotum

Die Studie wurde von der Ethikkommission (Ethikvotum Nr. 253/13, Eudract Nr. 2013-003705-26) der Medizinischen Universität Würzburg genehmigt. Es handelt sich um eine nicht-interventionelle Querschnittsstudie. Die Studie wurde nach den Kriterien der Deklaration von Helsinki 2013 durchgeführt (44).

3.2.2 Probanden

Alle Patienten und Kontrollprobanden wurden im ärztlichen Gespräch über die Studie aufgeklärt. Hierfür gab es je ein Informationsblatt für Erwachsene und eins für Kinder, welche ausgehändigt wurden. Waren die Eltern oder bereits volljährigen Jugendlichen einverstanden, wurde die Einverständniserklärung von ihnen sowie vom aufklärenden Arzt unterschrieben. Der Impfstatus vor allem der FSME-Impfungen wurde abgefragt und dokumentiert.

Die zusätzliche peripher-venöse Blutabnahme für die Studie erfolgte im Rahmen einer Routine-Blutabnahme.

Die Heparin-Röhrchen wurden mittels Ficoll Dichtegradzentrifugation weiter bearbeitet. Das Serum-Röhrchen wurde bei 3000rpm für 5 Minuten zentrifugiert und das Blutserum anschließend in einem bei -20 Grad Celsius eingefroren.

3.2.2.1 JIA-Probanden

Das untersuchte JIA-Patientenkollektiv (n=100) wurde in der Universitäts-Kinderklinik Würzburg und in dem Deutschen Zentrum für Kinder- und Jugendrheumatologie Garmisch-Patenkirchen (DZKJR) rekrutiert.

Das Alter des Patientenkollektivs war zwischen 5 und 19 Jahren, wobei die Diagnose vor dem 16. Lebensjahr gestellt werden musste, um als JIA entsprechend der ILAR Kriterien zu gelten (45). Da die erforderliche Blutmenge durch das Gewicht des Kindes limitiert wurde, konnten keine jüngeren Kinder mit eingeschlossen werden.

Als Einschlusskriterium musste jeder Proband mindestens drei dokumentierte Teilimpfungen gegen FSME in der Vergangenheit erhalten haben und somit vollständig grundimmunisiert gegen FSME sein. Der Abstand zwischen der letzten Impfung und der Blutentnahme spielte hierbei keine Rolle.

Ausschlusskriterien waren Begleiterkrankungen wie Malignome, monogenetische Syndrome (z. B. Trisomie 21) und Immundefekte, sowie eine bestehende Schwangerschaft und das Erhalten von Blutprodukten innerhalb der letzten drei Monate, sowie akute, medizinisch behandlungsbedürftige Infekte.

3.2.2.2 Kontroll-Probanden

Die Kontrollpersonen (n=31) bestand aus immunologisch gesunden und möglichst altersgleichen Kindern und Jugendlichen, welche an der Abteilung der Kinderchirurgie der Klinik & Poliklinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Gefäß- und Kinderchirurgie der Universitätsklinik Würzburg oder der Universitäts-Kinderklinik Würzburg zu einem elektiven Eingriff stationär waren. Ausschlusskriterien waren Autoimmunerkrankungen, Malignome, monogenetische Syndrome (z. B. Trisomie 21) und Immundefekte, Einnahme von immunologisch wirksamen Medikamenten, sowie eine bestehende Schwangerschaft und das Erhalten von Blutprodukten innerhalb der letzten drei Monate, sowie akute, medizinisch behandlungsbedürftige Infekte.

3.2.3 Ficoll Dichtegradientenzentrifugation

Die Ficoll Dichtegradientenzentrifugation ist ein Verfahren zur Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), bei welchem das heparinisierte Blut über das Ficoll geschichtet wird. Das Ficoll wirkt bei der Zentrifugation wie ein Filter, der je nach Dichte für die einzelnen Blutbestandteile mehr oder weniger durchlässig ist, und sich somit in der Interphase nur noch die peripheren mononukleären Zellen befinden.

Abbildung 5 zeigt die Aufteilung in die verschiedenen Schichten des Bluts nach Zentrifugation.

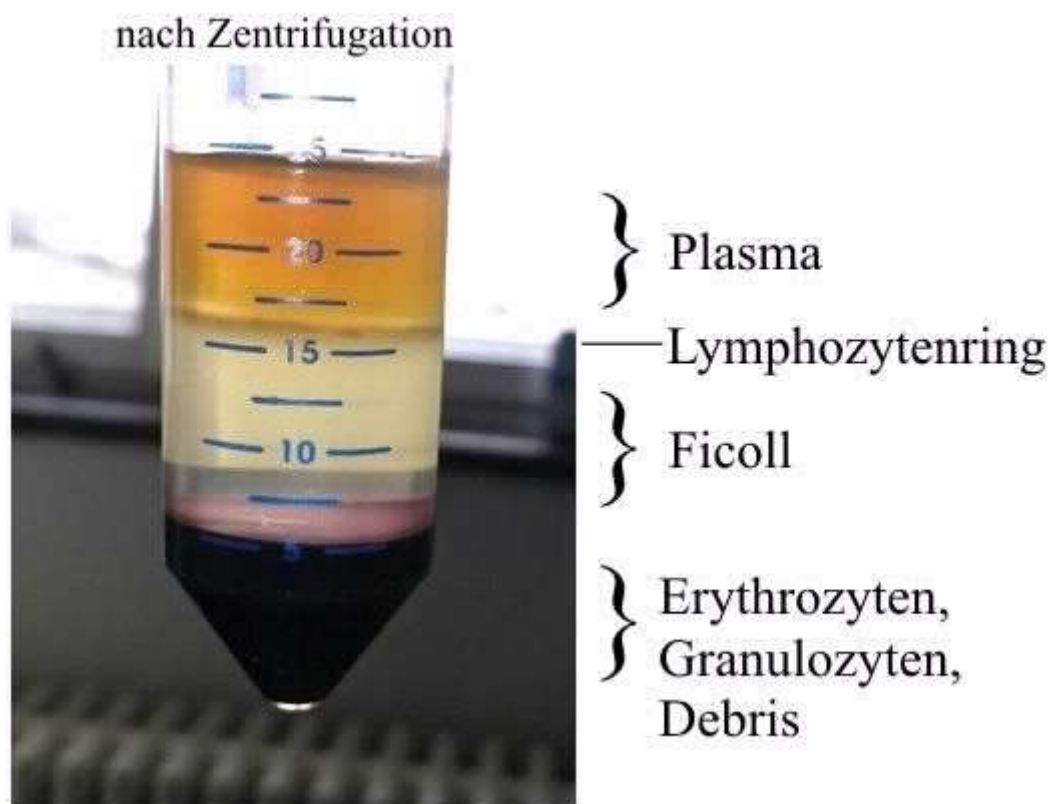


Abbildung 5: Falcon Tube nach dem Zentrifugieren mit Aufteilung der verschiedenen Schichten des Blutes. Vor der Zentrifugation wurde auf das Ficoll im Verhältnis 1:3 Vollblut pipettiert. Die Zellsuspension wurde mit 1700rpm für 25 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. [eigene Abbildung]

Unter sterilen Bedingungen wurde das Ficoll in ein 50ml Falcon Tube im Verhältnis 1:3 vorgelegt und das Vollblut anschließend mit Einmalpipetten überschichtet. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 1700rpm für 25 Minuten bei Raumtemperatur und ohne Bremse zentrifugiert. Die Lymphozyten der Interphase wurden mit einer 10ml Glaspipette geerntet, in ein neues 50ml Falcon Tube überführt und mit 0,9%igem NaCl bis auf 50ml aufgefüllt, um die Lymphozyten von überschüssiger Ficoll-Lösung zu

waschen. Dies wurde für 10 Minuten mit 1700rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das sichtbare Zellpellet mit 5ml Erythrozyten-Lysis-Puffer resuspendiert, welcher für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Danach wurden 10ml Ficoll-Nährmedium (RPMI + 1% Penicillin Streptomycin + 10% FCS) hinzugefügt und das Falcon Tube mit 1500rpm und bei Raumtemperatur für 5 Minuten erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 5ml Ficoll-Nährmedium resuspendiert.

3.2.3.1 Bestimmung der Zellzahl

Zum Zählen der Zellen wurde die Zellsuspension mit Trypanblau in einem Eppendorf Tube gemischt, resuspendiert und anschließend in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden zwei Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Die Zellzahl wurde wie folgt ausgerechnet:

$$\text{Mittelwert der gezählten Zellen} \times 10^4 \times \text{ml der resuspendierten Nährlösung}$$

3.2.3.2 Kryokonservierung

Das Falcon Tube mit der Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur mit 1500rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit Einfriermedium resuspendiert. Zum Einfrieren soll die Zellzahl etwa 5×10^6 Zellen/ml/Röhrchen betragen. Dementsprechend viel Einfriermedium wurde verwendet und je 1ml pro beschriftetem Kyro-Röhrchen mit Drehverschluss für mindestens zwei Tage bei -80 Grad Celsius eingefroren. Anschließend wurden die Kyro-Röhrchen nach maximal einem Monat in Stickstoff eingefroren.

3.2.4 IgG-anti-FSME-Konzentrations-ELISA

Die IgG-anti-FSME-Konzentration wurde durch einen ELISA (Enzygnost, Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland) in Kooperation mit Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Michael Kleines von der Universitätsklinik RWTH Aachen ermittelt.

Der ELISA wurde nach dem Standardprotokoll durchgeführt.

Die IgG-anti-FSME-Konzentration wurde bei < 120 VIE/ml als negativ, bei $120 - < 165$ VIE/ml als grenzwertig und bei ≥ 165 VIE/ml als positiv gewertet.

3.2.5 IgG-anti-FSME-Aviditäts-ELISA

Die Avidität ist die synergistische Bindungsstärke von Antikörpern und ein guter Langzeit-Parameter der humoralen Immunität nach Impfungen.

Das Testsystem für die Bestimmung der Avidität von Antikörpern gegen FSME-Viren (IgG) besteht aus dem Testsatz Anti-FSME-Viren-ELISA, der positiven Kontrolle HA mit hoch-aviden Antikörpern gegen FSME-Viren (IgG, human), der positiven Kontrolle LA mit niedrig-aviden Antikörpern gegen FSME-Viren (IgG, human), einer Harnstofflösung für Anti-FSME-Viren-ELISA, einem Phosphatpuffer und einer Arbeitsanleitung, auf der die folgenden Ausführungen basieren.

Zunächst wurden die Seren der Patientenproben aufgetaut und mit dem Probenpuffer je nach IgG-anti-FSME-Konzentration verdünnt. Diejenigen Proben, deren IgG-anti-FSME-Konzentration unter 1000 war, wurden im Verhältnis 1:101 und diejenigen mit IgG-anti-FSME-Konzentration über 1000 im Verhältnis 2:202 verdünnt.

Entsprechend dem Pipettierschema wurden je 100µl der verdünnten Seren als Doppelwert in die einzelnen Reagenzgefäße zwei verschiedener Mikrotiterstreifen pipettiert und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Inkubation wurden die Reagenzgefäße entleert und einmal mit jeweils 300µl gebrauchsfertig verdünntem Waschpuffer gewaschen. Dies wurde mit Hilfe eines Flaschendispensers durchgeführt. Pro Waschzyklus sollte der Waschpuffer für 30-60 Sekunden einwirken und dann ausgeschüttet werden. Nach dem Waschvorgang wurde die Mikrotiterplatte mit den Öffnungen nach unten kräftig auf Vliespapier ausgeschlagen, um Waschpufferreste vollständig zu entfernen.

Als zweiter Schritt wurden jeweils 200µl Harnstofflösung in die Reagenzgefäße des ersten Mikrotiterstreifens sowie 200µl PBS in die Reagenzgefäße des zweiten Mikrotiterstreifens pipettiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde nach dem oben beschriebenen Waschvorgang dreimal gewaschen.

Als nächstes wurde je 100µl Enzymkonjugat-Lösung (Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgG) in die Reagenzgefäße pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wieder nach der obigen Anleitung dreimal gewaschen.

Als vierter Schritt wurden jeweils 100µl Chromogen/Substrat-Lösung in die Reagenzgefäße pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei sollten die Mikrotiterplatte vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt werden. Zum Stoppen der Reaktion wurden anschließend je 100µl Stopplösung in die Reagenzgefäße

pipettiert. Dies sollte in der gleichen Reihenfolge und Geschwindigkeit wie bei der Zugabe der Chromogen/Substrat-Lösung erfolgen.

Innerhalb von 30 Minuten sollte jetzt die photometrische Auswertung der Farbintensität bei 450nm Messwellenlänge und einer Referenzwellenlänge zwischen 620nm und 650nm erfolgen. Vor dem Messen sollte die Mikrotiterplatte vorsichtig geschüttelt werden, um eine homogene Verteilung der Farblösung zu gewährleisten.

Der relative Aviditätsindex (RAI) berechnet sich folgendermaßen:

$$\text{RAI in \%} = \frac{\text{Extinktion mit Urea} \times 100}{\text{Extinktion ohne Urea}}$$

Ein RAI < 40% wurde als Hinweis auf niedrig-avide Antikörper und ein RAI > 60% als Hinweis auf hoch-avide Antikörper gewertet (46). Ein relativer Aviditätsindex dazwischen wurde als Grenzbereich definiert.

3.2.6 Neutralisationstest

Der Neutralisationstest ist eine serologische Nachweismethode von neutralisierenden Antikörpern und entstand in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Karin Stiasny von der Medizinischen Universität Wien.

Zum Nachweis neutralisierender Antikörper wurde auf Mikrotiterplatten eine zweifache Serumverdünnungsreihe anfänglich mit der Verdünnung 1:10 hergestellt. Anschließend wurden sie mit 25 PFU (Plaque forming units) des FSME-Virus für eine Stunde bei 37 Grad Celsius inkubiert. Nach dieser Zeit wurden Nierenzellen von jungen Hamstern (ATCC BHK-21) in die einzelnen Wells pipettiert und für drei Tage bei 37 Grad Celsius inkubiert.

Das Vorhandensein des Virus wurde durch einen ELISA des Überstands bestimmt. Der Neutralisationstiter wurde definiert als die Reziproke derjenigen Serumverdünnung, welche im Test zu einer 90%igen Reduktion in der Absorptionauslesung verglichen mit der Negativkontrolle ohne Antikörper führte (27).

Jedes Serum wurde mindestens zweimal getestet und das geometrische Mittel der Titer wurde errechnet. Ein Neutralisationstiter über 1:10 wurde als positiv gewertet.

3.2.7 Interferon gamma – ELISPOT

ELISPOT steht für Enzyme-linked-immuno-Spot und ist ein sensitives Verfahren zur Messung der Zellaktivität auf Einzelzellniveau. Es wurde hiermit die FSME-spezifische zelluläre Reaktivität gemessen.

3.2.7.1 Versuchsprotokoll

Der Versuch wird an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

Am ersten Tag wurde die 96-Well-Platte aktiviert. Dies erfolgte unter sterilen Bedingungen durch die Pipettierung von jeweils 100µl 70%igen Ethanols in die einzelnen Wells und anschließender Inkubation von zwei Minuten. Die 96-Well-Platte wurde ausgeschüttet und kräftig geschüttelt, damit möglichst wenig Ethanol in den einzelnen Wells bleibt. Dann wurden je 200µl destilliertes Wasser pro Well pipettiert und erneut für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde wieder ausgeschüttet und ausgeschüttelt. Es wurden 200µl steriles PBS pro Well pipettiert und für 5 Minuten inkubiert. Dieser Vorgang wurde zweimal durchgeführt und anschließend wurden die Wells wieder ausgeschüttet und kräftig ausgeschüttelt. Als letztes wurden 50µl des Interferon-γ-Antikörpers (mAb 1-D1K) mit der Konzentration 5µg/ml in sterilem PBS pro Well pipettiert und bei -4 Grad Celsius bis zum nächsten Tag inkubiert.

An Tag 2 wurde die 96-Well-Platte wieder unter sterilen Bedingungen ausgeschüttet und kräftig ausgeschüttelt. Anschließend wurden 200µl BSA 5% PBS pro Well pipettiert und für eine Stunde bei 37 Grad Celsius im Brutschrank inkubiert. Die in Stickstoff eingefrorenen PBMCs der Probanden wurden im 37 Grad Celsius warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend schnell in 10ml ebenfalls erwärmtes ELISPOT-Nährmedium (RPMI + 1% Penicillin Streptomycin + 7% FCS) gegeben. Anschließend wurden sie bei 1500rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand dann abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 5ml Nährmedium (RPMI + 1% Penicillin Streptomycin) resuspendiert. Danach wurde das Zentrifugieren und die Resuspension in 5ml Nährmedium noch zweimal wiederholt, um tote Zellen aus dem Zellpellet zu reinigen.

Zum Zählen der Zellen wurde die Zellsuspension mit Trypanblau in einem Eppendorf Tube gemischt, resuspendiert und anschließend in eine Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden zwei Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Die Zellzahl wurde wie folgt ausgerechnet:

Mittelwert der gezählten Zellen × 10⁴ × ml der resuspendierten Nährlösung

Anschließend wurde das 15ml Falcon Tube erneut bei 1500rpm für 5 Minuten zentrifugiert und dann in X-Vivo resuspendiert, sodass die Zellzahl pro Tube 2×10^6 Zellen/ml betrug.

Pro Proband wurden jeweils 9 Wells mit $100 \mu\text{l}$ und $0,2 \times 10^6$ Zellen/Well in X-Vivo benötigt. Die neun Wells bestehen aus drei Triplets mit je $100 \mu\text{l}$ X-Vivo als Negativkontrolle, $100 \mu\text{l}$ Anti-FSME-Antigen (FSME-Ticovac like) mit der Konzentration $0,3 \mu\text{g/ml}$ in X-Vivo und $100 \mu\text{l}$ PHA mit der Konzentration $0,5 \mu\text{g/ml}$ in X-Vivo als Positivkontrolle. Die Triplets sind in Abbildung 6 beispielhaft dargestellt.

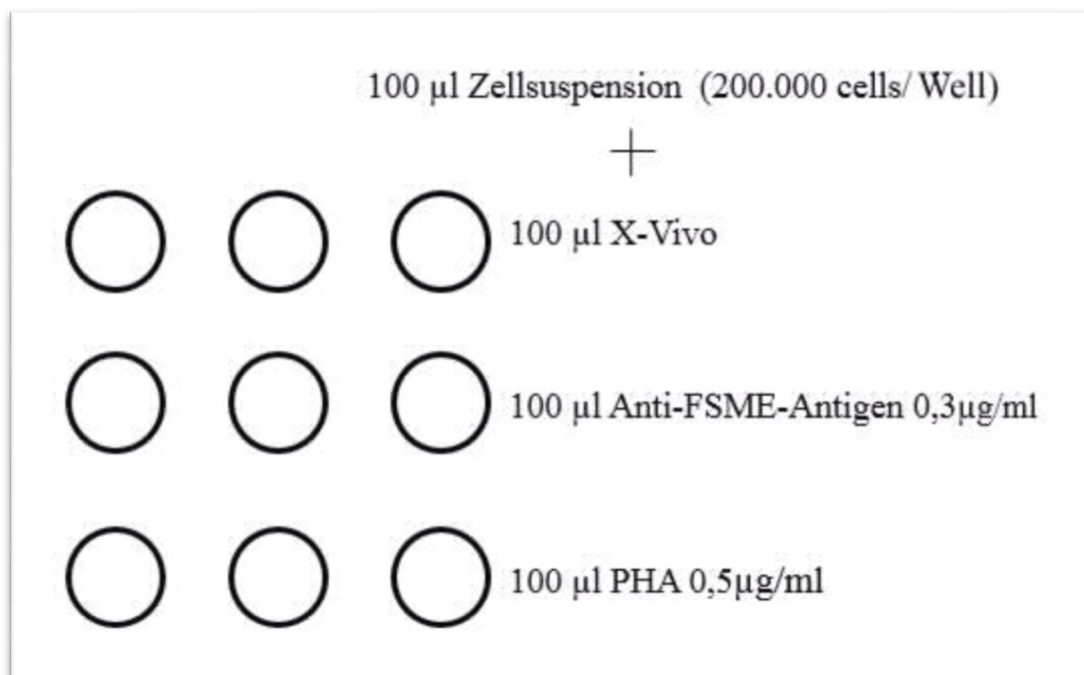


Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der drei Triplets des INF γ -ELISPOTS bei einer Probandenprobe mit der jeweiligen Verteilung der Negativ- (X-Vivo), Positivkontrolle (PHA $0,5 \mu\text{g/ml}$) und dem Anti-FSME-Antigen zur Pipettierung.

Da das Endvolumen $200 \mu\text{l/Well}$ betrug, wurden die Konzentrationen von dem FSME-Antigen auf $0,6 \mu\text{g/ml}$ und von PHA auf $1,0 \mu\text{g/ml}$ in X-Vivo angeglichen.

Anschließend wurde die 96-Well-Platte für 20 Stunden bei 37 Grad Celsius inkubiert.

Am dritten Tag wurde die 96-Well-Platte ausgeschüttet und dann sechsmal mit $200 \mu\text{l}$ PBS gewaschen. Hierfür wurde ein Flaschendispenser benutzt. Nach jedem Waschvorgang wurde das PBS ausgeschüttet und die 96-Well-Platte mit dem Öffnungen nach unten kräftig auf Vliespapier ausgeklopft, um restliche PBS-reste vollständig zu entfernen.

Anschließend wurden 50µl/Well des biotinylierten Interferon-γ-Antikörpers (mAB 7-B6-1-Biotin) in einer Konzentration von 2µg/ml in BSA 0,5% PBS pipettiert und für eine Stunde bei 37 Grad Celsius im Brutschrank inkubiert. Dann wurde die 96-Well-Platte wieder nach obiger Anleitung sechsmal mit 200µl PBS gewaschen.

Jetzt wurden 100µl/Well des AKP Streptavidins in einer Verdünnung 1:1000 in sterilem PBS pipettiert und wieder für eine Stunde bei 37 Grad Celsius im Brutschrank inkubiert. Danach wurde erneut nach obiger Anleitung sechsmal mit 200µl PBS gewaschen.

Als letzter Schritt wurden 100µl/Well des BCIP/NBT Plus – Substrats pipettiert, nachdem es durch einen 0,45µm-Filter filtriert wurde. Anschließend wurde die 96-Well-Platte im Dunkeln und bei Raumtemperatur für 6 Minuten inkubiert und dann ausgeschüttet und zweimal mit Wasser gewaschen und ausgeklopft.

Mindestens zwei Tage später, wenn die 96-Well-Platte getrocknet war, wurden die 96-Well-Platten mittels ImmunoCapture 6.2 und ImmunoSpot (CTL, Bonn, D) fotografiert und die Spots gezählt.

Alle Angaben der Spot forming Units (SFU) sind ein Mittelwert der Triplets und auf eine Millionen Zellen hochgerechnet. Bei Angabe der Positivkontrolle mit PHA und den SFU/10⁶ PBMCs, die mit dem Anti-FSME-Antigen stimuliert wurden, handelt es sich um die Differenz zwischen den SFU der Positivkontrolle bzw. mit Anti-FSME-Antigen stimuliert und der der Negativkontrolle:

$$\begin{aligned} & \text{SFU/10}^6 \text{ PBMCs Positivkontrolle} - \text{SFU/10}^6 \text{ PBMCs Negativkontrolle} \\ & \text{SFU/10}^6 \text{ PBMCs Stimuliert} - \text{SFU/10}^6 \text{ PBMCs Negativkontrolle} \end{aligned}$$

3.2.7.2 Vorversuche

Insgesamt wurden drei Vorversuche zum INF γ-ELISPOT durchgeführt. Im Folgenden werden nur die Abweichungen zum endgültigen Protokoll beschrieben.

Tag 1 wurde im ersten Vorversuch verglichen mit dem endgültigen ELISPOT-Protokoll nicht abgeändert, sondern mit gleichen Konzentrationen und Materialien durchgeführt. Am zweiten Tag wurde die 96-Well-Platte mit 200µl/Well ELISPOT-Nährmedium (RPMI + 1% Penicillin Streptomycin + 7% FCS) blockiert und eine Verdünnungsreihe mit dem Anti-FSME-Antigen angelegt. Die Konzentrationen 0,3µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, und 2,0 µg/ml wurden je als Triplets bei zwei Probanden mit Grundimmunisierung gegen FSME und zwei nicht-geimpften Probanden in die Wells pipettiert. Außerdem wurden eine Negativkontrolle mit ELISPOT-Nährmedium und eine

Positivkontrolle mit 0,5µg/ml PHA pipettiert. Am dritten Versuchstag wurden die Waschvorgänge mit 200µl PBS/Tween 20 0,01% durchgeführt. Der biotinylierte Interferon-γ-Antikörper (mAB 7-B6-1-Biotin) wurde mit einer Konzentration von 2µg/ml in BSA 0,5% PBS pipettiert und je 100µl in die Wells pipettiert. Die Inkubation des BCIP/NBT Plus – Substrats wurde bei Dunkelheit für 10 Minuten inkubiert.

Abbildung 7 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse dieses Vorversuches. Die abfotografierten Wells zeigen deutlich die Spot forming units. Auch der Unterschied zur Negativ- und Positivkontrolle sind gut erkennbar. Bei allen vier verschiedenen Konzentrationen von dem Anti-FSME-Antigen zeigen sich gute Ergebnisse. Um an Material zu sparen, wurde beschlossen bei einem nächsten Vorversuch eine Stimulation mit 0,3µg/ml und 0,5 µg/ml Anti-FSME-Antigen durchzuführen.

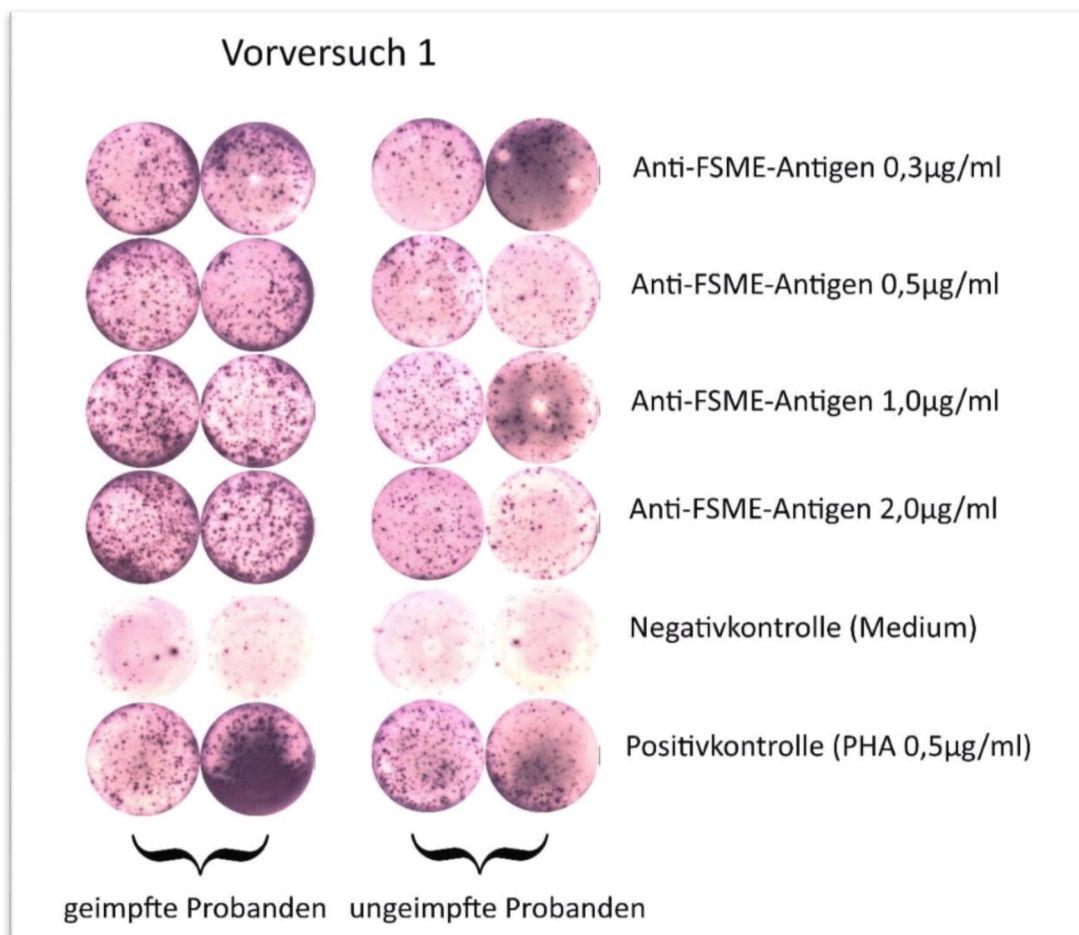


Abbildung 7: INF γ -ELISPOT Ergebnisse des Vorversuchs 1. Stimulation durch verschieden hohe Konzentrationen von Anti-FSME-Antigen. Es wurden je zwei Probanden mit FSME-Impfungen und zwei ohne FSME-Impfungen verglichen. Zur Kontrolle wurden noch eine Negativkontrolle ohne Stimulantien und einen Positivkontrolle mit PHA-Stimulierung angelegt [eigene Abbildung].

Tabelle 9 stellt die Mittelwerte der SFU/10⁶ PBMCs des ersten Vorversuches dar.

Anti-FSME- Antigen	INF γ – ELISPOT [SFU/10 ⁶ PBMCs]			
	Geimpfte Probanden		Nicht geimpfte Probanden	
	Proband 1	Proband 2	Proband 3	Proband 4
0,3 μ g/ml	254	415	303	218
0,5 μ g/ml	53	374	275	175
1,0 μ g/ml	115	395	357	184
2,0 μ g/ml	146	447	364	244

Tabelle 9: INF γ -ELISPOT Ergebnisse des Vorversuchs 1. Gegenüberstellung von gesunden Probanden mit und ohne Impfungen gegen FSME bei verschiedener hoher Stimulation mit Anti-FSME-Antigen. Angabe der Ergebnisse als Mittelwert in SFU/1 Millionen Zellen und nach Abzug der SFU/10⁶ PBMCs der Negativkontrolle.

Im zweiten Vorversuch wurde die 96-Well-Platte am ersten Tag mit 50 μ l/Well Interferon- γ -Antikörpers (mAb 1-D1K) mit den Konzentration 5 μ g/ml und 10 μ g/ml pipettiert. Am zweiten Tag wurde die 96-Well-Platte zur Hälfte mit 200 μ l BSA 5% PBS und zur anderen Hälfte mit Ficoll-Nährmedium (RPMI + 1% Penicillin Streptomycin + 10% FCS) geblockt, so dass vier Quadranten entstanden: BSA 5% PBS + Interferon- γ -Antikörper 5 μ g/ml, BSA 5% PBS + Interferon- γ -Antikörper 10 μ g/ml, Ficoll-Nährmedium + Interferon- γ -Antikörper 5 μ g/ml und Ficoll-Nährmedium + Interferon- γ -Antikörper 10 μ g/ml. Die verwendeten Probanden waren beide gesund und nicht gegen FSME geimpft. Die Konzentration des Anti-FSME-Antigens betrug 0,3 μ g/ml und 0,5 μ g/ml, außerdem wurden wieder eine Negativ- und Positivkontrolle durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt. Trotz dunklerem Hintergrund sind die Spot forming units erkennbar.

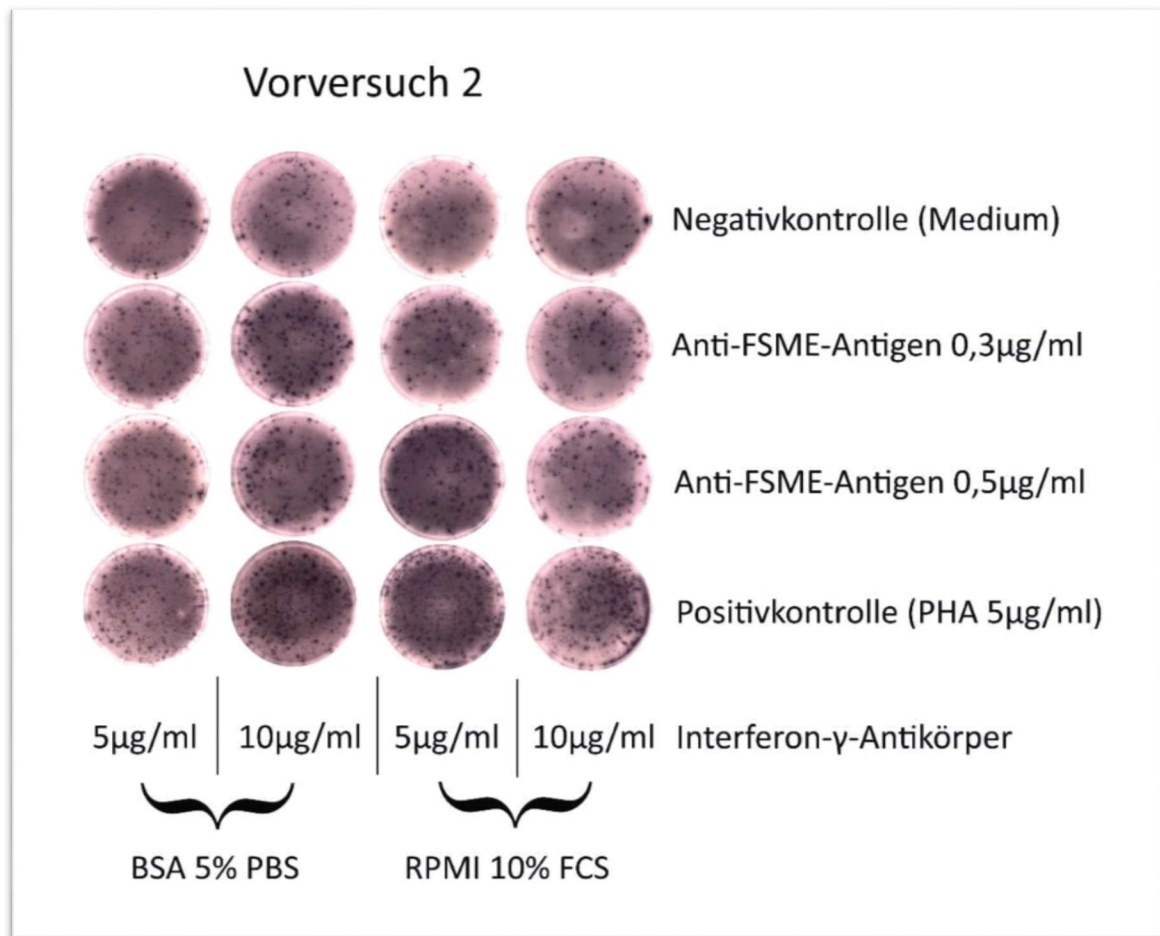


Abbildung 8: INF γ -ELISPOT Ergebnisse des Vorversuchs 2. Coating der Platte mit verschiedenen Konzentrationen des INF γ -Antikörpers und Stimulierung am nächsten Tag mit verschiedenen Konzentrationen des Anti-FSME-Antigens, welches zur Hälfte in BSA 5% PBS und zur anderen Hälfte in RPMI 7% FCS pipettiert wurde. Zur Kontrolle wurde eine Negativkontrolle ohne Stimulation und eine Positivkontrolle mit Stimulation mit PHA erstellt [eigene Abbildung].

In Tabelle 10 sind die SFU/10⁶ PBMCs als Mittelwerte der jeweiligen Triplets aufgezählt. Die besten Ergebnisse ergaben sich für eine Stimulation mit 0,3µg/ml Anti-FSME-Antigen in 5µg/ml BSA mit 82,8 SFU/10⁶ PBMCs oder für eine Stimulation mit 0,5µg/ml Anti-FSME-Antigen in 10µg/ml BSA mit 112,7 SFU/10⁶ PBMCs.

INF γ -ELISPOT [SFU/10 ⁶ PBMCs]				
	BSA 5% PBS		RPMI 7% FCS	
INF γ -Antikörper [μ g/ml]	5	10	5	10
Anti-FSME-Antigen				
0,3 μ g/ml	83	57	16	21
0,5 μ g/ml	59	113	-24	14

Tabelle 10: INF γ -ELISPOT Ergebnisse des Vorversuchs 2. Gegenüberstellung der SFU/10⁶ PBMCs bei den verschiedenen Konzentrationen des INF γ -Antikörpers und Anti-FSME-Antigens. Es handelte sich um nicht geimpfte gesunde Probanden. Angabe der Ergebnisse als Mittelwert in SFU/1 Millionen Zellen und nach Abzug der SFU/10⁶ PBMCs der Negativkontrolle.

Im dritten und letzten Vorversuch wurden am ersten Tag wieder die gleichen Materialien und Konzentrationen wie im endgültigen ELISA-Protokoll verwendet. Es handelte sich um zwei gesunde Probanden, die jeweils die Grundimmunisierung gegen FSME erhalten hatten. Am zweiten Tag wurde die gesamte 96-Well-Platte mit 200 μ l BSA 5% PBS geblockt. Die Verteilung der Konzentrationen des Anti-FSME-Antigens wurde wie im Vorversuch 2 vorgenommen, die eine Hälfte der Zellen und des Antigens wurden in RPMI 7% FCS pipettiert, während für die andere Hälfte X Vivo Medium benutzt wurde. Am Versuchstag 3 wurde die 96-Well-Platte jeweils sechsmal mit 200 μ l PBS gewaschen. Der biotinylierte Interferon- γ -Antikörper (mAB 7-B6-1-Biotin) wurde mit einer Konzentration von 2 μ g/ml in BSA 0,5% PBS pipettiert und je 50 μ l in die Wells pipettiert. Die Inkubation des BCIP/NBT Plus – Substrats wurde bei Dunkelheit für 6 Minuten inkubiert.

Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse dieses letzten Vorversuchs mit der Gegenüberstellung der zwei Medien, die verwendet wurden. Der Mittelwert der SFU/10⁶ PBMCs bei der Negativkontrolle war mit X-Vivo bei 87,5 SFU/10⁶ PBMCs während er bei RPMI 7% FCS bei 144,3 SFU/10⁶ PBMCs lag.

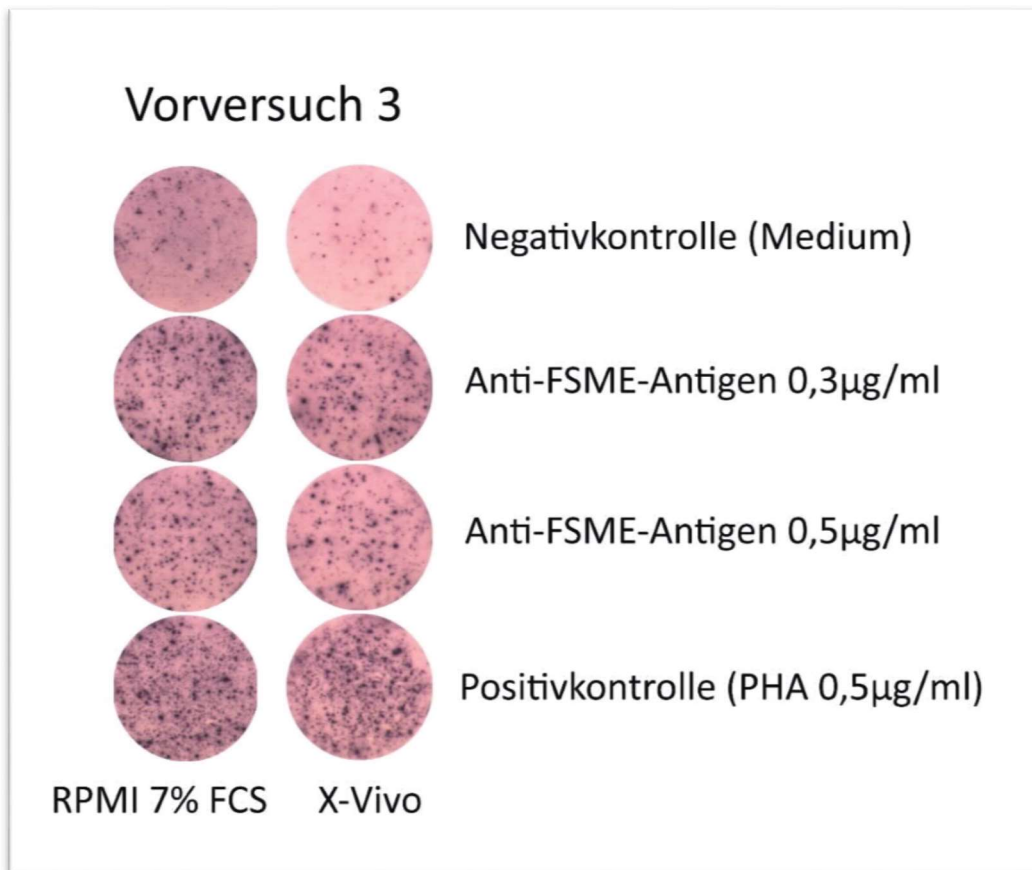


Abbildung 9: INF γ -ELISPOT Ergebnisse des Vorversuchs 3. Die Zellen zweier gesunder Probanden mit Impfungen gegen FSME wurden je zur Hälfte in RPMI 7% FCS und in X-Vivo pipettiert. Zur Stimulation wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen von Anti-FSME-Antigen ausprobiert, sowie zur Kontrolle eine Negativkontrolle ohne Stimulanzien und eine Positivkontrolle mit Stimulation durch PHA.

In Tabelle 11 ist die Gegenüberstellung anhand der Mittelwerte der SFU/10⁶ PBMCs für die Stimulationen mit dem Anti-FSME-Antigen aufgezeigt. Mit einer Stimulation durch 0,3µg/ml Anti-FSME-Antigen in X-Vivo konnte der höchste Mittelwert von 85 SFU/10⁶ PBMCs erzielt werden.

	INF γ -ELISPOT [SFU/10 ⁶ PBMCs]	
	RPMI 7% FCS	X-Vivo
Anti-FSME-Antigen		
0,3µg/ml	55	85
0,5µg/ml	42	68

Tabelle 11: INF γ -ELISPOT Ergebnisse des Vorversuchs 3. Gegenüberstellung der Mittelwerte der ausgerechneten SFU/10⁶ PBMCs, welche zur Hälfte in RPMI 7% FCS und zur anderen Hälfte in X-Vivo stimuliert wurden. Stimuliert wurde je mit 0,3µg/ml und 0,5µg/ml Anti-FSME-Antigen. Bei den verwendeten Blutproben handelte es sich um gesunde Probanden mit ≥ 3 FSME-Impfungen. Angabe der Ergebnisse als Mittelwert in SFU/1 Millionen Zellen und nach Abzug der SFU/10⁶ PBMCs der Negativkontrolle.

3.2.8 Statistische Auswertungen

Die Fallzahlschätzung beruht auf einer vorherigen Studie zur FSME-Impfung bei thymektomierten Patienten (43), die vergleichbar immundefizient in ihrer T-Zell-Aktivität sind wie JIA-Patienten. Eine Anzahl von 36 Patienten wurde berechnet, um eine statistische Power von 90% zu sichern.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Analyse-Software IBM SPSS Statistics, Version 24 (Chicago, IL, USA). Die Graphiken wurden mit Graph Pad Prism Version 6 (San Diego, CA, USA) erstellt.

Bei der deskriptiven Statistik dienten Kreuztabellen der Darstellung von Zusammenhängen von nominalen Variablen und zum Vergleich von Häufigkeitsdarstellungen durch den Chi-Quadrat-Test nach Pearson.

Zur analytischen Statistik eignete sich zur Überprüfung der Normalverteilung der Shapiro-Wilk Test. Der Mann-Whitney-U-Test wurde zur Überprüfung von signifikanten Unterschieden bei nicht verbundenen, nicht parametrischen Variablen angewendet. Der Spearman Rank Korrelationstest wurde zur Untersuchung, ob zwei stetige nicht normalverteilte Variablen einen Zusammenhang haben, angewendet.

Werte für $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristiken der Patienten- und Kontrollpopulation

Die analysierte Patientenpopulation setzte sich aus 100 Patienten mit JIA zusammen, welche eine vollständige Grundimmunisierung mit FSME hatten. Aufgrund von zu wenigen FSME-Impfungen oder nicht vorhandenen Impfdaten mussten zwölf Patienten trotz Einwilligung im Nachhinein ausgeschlossen werden. Das Alter bei Rekrutierung und Blutabnahme war im Mittel 14 Jahre und die Patienten waren zu 63% weiblich. Bei Diagnosestellung waren die Patienten im Mittel neun Jahre alt, siehe Tabelle 12. Bei 27% der Patienten mit JIA wurde die Diagnose bereits vor der ersten FSME-Impfung gestellt, was bedeutet, dass bei 73 Patienten die Grundimmunisierung bereits vor Stellung der Diagnose abgeschlossen war. Bei 36% der Patienten war die Diagnosestellung vor der ersten Boosterimpfung gegen FSME. Insgesamt erhielten 62 JIA Patienten mindestens eine Boosterimpfung, 43 Patienten (69.4%) hatten eine, 15 (24.2%) zwei und 4 (6.5%) hatten drei Boosterimpfungen.

In Tabelle 12 ist die Verteilung der JIA-Subgruppen innerhalb der Patientenpopulation zu sehen: 33 der Patienten fielen in die Klassifikationskategorie Oligoarthritis, 17 Patienten hatten einen Rheumafaktor negative Polyarthritis, während nur ein Patient als Rheumafaktor positive Polyarthritis klassifiziert wurde. Bei acht Patienten handelte es sich um eine Enthesitis-assoziierte Arthritis, bei elf um eine Psoriasis Arthritis und bei sieben um eine systemische Arthritis. 16 Patienten konnten nicht in eine der obigen Subgruppen klassifiziert werden und fielen damit in die Kategorie nicht-klassifizierte Arthritis und bei sieben JIA-Patienten fehlte eine ausreichende Dokumentation. Bei der Hälfte aller Patienten wurde ein positiver ANA-Wert gemessen, neun Patienten waren HLA-B27 positiv und bei zwei Patienten war der Rheumawert positiv. Zur Beschreibung der Krankheitsaktivität beim Zeitpunkt der Blutabnahme wurden die Entzündungsparameter C-reaktives Protein (CRP) und die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) bestimmt, welche beide im Mittel im Normbereich lagen (CRP < 0,05 mg/dl, BSG < 15 mm/h). Auch die Parameter des Blutbilds lagen als Mittelwert im altersgemäßen Normbereich (Leukozyten 4.500 – 13.000/ μ l, Lymphozyten 26 – 50%, Thrombozyten 150.000 – 450.000/ μ l, Hämoglobin 12 – 16g/dl) (47).

Der direkte Vergleich zwischen den Patienten und der gesunden Kontrollprobanden ist in Tabelle 12 aufgezeigt. Die Population der gesunden Kontrollen bestand aus 31 Kindern und Jugendlichen mit einem mittleren Alter von zwölf Jahren. Etwa 45% waren Mädchen.

Auch hier mussten vier Probanden aufgrund von zu wenigen FSME-Impfungen oder nicht vorhandenen Impfdaten trotz Einwilligung im Nachhinein ausgeschlossen werden. Sowohl die Entzündungsparameter als auch das Blutbild waren im Mittelwert im altersgemäßen Normbereich.

18 Kontrollprobanden erhielten Boosterimpfungen: 14 Kontrollen hatten eine (77.8%) Boosterimpfung und vier zwei (22.3%) Boosterimpfungen. Die Zeit seit der vollständigen Grundimmunisierung und seit dem letzten Booster zeigte zwischen den JIA Patienten und der gesunden Kontrollen keinen signifikanten Unterschied. Der Median aller erhaltenen FSME-Impfungen lag bei beiden Gruppen bei vier Impfungen.

	Patienten mit JIA	gesunde Kontrollen ^a	p-Wert
Anzahl (Grundimmunisierung vorhanden)	100	31	-
Weibliches Geschlecht (n, %)	63; 63.0	14; 45.2	0.079
Alter (Jahre) ^b	14.2±3.2 (14.8; 5.8-19.9)	12.0 ± 2.9 (11.9; 5.9-17.6)	0.001
Alter bei Diagnosestellung (Jahre) ^b	8.9±5.0 (9.3; 0.6-17.4)	n. z.	-
Krankheitsdauer (Jahre) ^{b c}	5.0±4.7 (3.8; 0.0-17.2)	n. z.	-
Klassifikation			
Oligoarthritis (n; %)	33; 33.0	n. z.	-
RF negative Polyarthritis (n; %)	17; 17.0	n. z.	-
RF positive Polyarthritis (n; %)	1; 1.0	n. z.	-
Enthesitis-assoziierte Arthritis (n; %)	8; 8.0	n. z.	-
Psoriasis Arthritis (n; %)	11; 11.0	n. z.	-
Systemische JIA (n; %)	7; 7.0	n. z.	-
Unklassifizierte JIA (n; %)	16; 16.0	n. z.	-
Nicht dokumentierte Klassifikation (n; %)	7; 7.0	n. z.	-
ANAs positiv (n, %)	50; 50.0	n. z.	-
HLA-B27 positiv (n, %)	9; 9.0	n. z.	-
RF positiv (n, %)	2; 2.0	n. z.	-
Krankheitsaktivität			
CRP (mg/dl) ^b	0.2±0.7 (0.0; 0.0-5.0)	0.1±0.1 (0.0; 0.0-0.3)	0.313
BSG (mm/h) ^b	10.7±13.7 (6.0; 1.0-73.0)	6.4±2.5 (5.0; 4.0-10.0)	0.909
Blutbild			
Leukozyten (tsd/μl) ^b	6.9±2.0 (7.0; 3.6-13.8)	6.6±1.9 (7.0; 4.2-9.9)	0.650
Lymphozyten (% der Leukozyten) ^b	31.3±10.1 (31.7; 11.3-53.6)	36.1±9.3 (38.6; 21.8-49.2)	0.174
Thrombozyten (tsd/μl) ^b	274.2 ± 67.3 (270.5; 65.0-491.0)	328.3 ± 74.1 (320.0; 234.0-487.0)	0.040
Hämoglobin (g/dl) ^b	13.5 ± 1.7 (13.5; 6.9-17.9)	13.4 ± 1.4 (13.5; 10.7-15.5)	0.965
FSME-Impfdaten			
Zeit seit der vollständigen Grundimmunisierung (Jahre) ^{b c}	6.4±2.9 (5.8; 0.3-16.1)	6.0±2.9 (6.2; 0.2-10.5)	0.614
Zeit seit der letzten Boosterimpfung (Jahre) ^{b c}	4.0±2.6 (3.5; 0.0-9.1)	3.5±2.2 (3.3; 0.0-6.5)	0.470
JIA-Diagnose vor der 1. Impfung (n, %)	27; 27.0	n. z.	-
JIA-Diagnose vor dem 1. Booster (n, %)	36; 36.0	n. z.	-

Tabelle 12: Charakteristiken der Population. Legende: ^a da einige Kontrollen nicht selbst rekrutiert wurden, ist nicht von allen ein Blutbild vorhanden, ^b Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minium-Maximum), ^c Datumsdifferenzen wurde mithilfe des Datums der Blutentnahme errechnet. (Abkürzungen: JIA: Juvenile idiopathische Arthritis, ANA: anti-nukleäre Antikörper, RF: Rheumafaktor, BSG: Blutsenkungsgeschwindigkeit, CRP: C-reaktives Protein, n. z.: nicht zutreffend, FSME: Frühsommer-Meningoenzephalitis)

In Tabelle 13 wird die medikamentöse Therapie dargestellt, welche die Patienten mit JIA einerseits während der primären Impfung (Grundimmunisierung mit drei Teilimpfungen) gegen FSME nach Diagnosestellung und andererseits während der Blutabnahme bei Rekrutierung einnahmen. Insgesamt war bei 16% der Patienten während der ersten FSME-Impfung und bei 54% während der Blutentnahme eine medikamentöse Therapie bekannt.

	Medikamente während der primären Impfung nach JIA Diagnosestellung ^a	Medikamente der JIA-Patienten bei der Blutentnahme	p-Wert
NSAID (n; %)	11; 11.0	37; 37.0	0.874
MTX (n; %)	10; 10.0	35; 35.0	0.001
Hydroxychloroquin (n; %)	2; 2.0	3; 3.0	0.001
Leflunomid (n; %)	0; 0	2; 2.0	-
Azathioprin (n; %)	0; 0	1; 1.0	-
Sulfasalazin (n; %)	1; 1.0	4; 4.0	0.995
Glucocorticoide (n; %)	1; 1.0	7; 7.0	0.920
TNF-α-Blocker (n; %)	3; 3.0	14; 14.0	0.002
Etanercept (n; %)	2; 2.0	10; 10.0	0.001
Adalimumab (n; %)	1; 1.0	3; 3.0	0.034
Infliximab (n; %)	0; 0	1; 1.0	-
IL-6-Blocker (n; %)	0; 0	1; 1.0	-
Tocilizumab (n; %)	0; 0	1; 1.0	-
IL-1-Blocker (n; %)	1; 1.0	1; 1.0	0.011
Anakinra (n; %)	1; 1.0	1; 1.0	0.011

Tabelle 13: Medikamentöse Therapie der Patienten mit JIA während der primären FSME-Impfung nach Diagnosestellung und während der Blutabnahme. Legende: ^a Durch den langen Zeitraum der oft häufigen Impfungen und der teilweise weit zurückliegenden Impfdaten, ist nicht von allen Patienten die genaue Therapie in der Vergangenheit bekannt (Abkürzungen: NSAID: Non-steroidal anti-inflammatory drug, MTX: Methotrexat, TNF- α : Tumornekrosefaktor alpha, IL-6/1: Interleukin 6/1). P-Werte nach Spearman Rank Korrelationstest. Standarddosierungen: NSAID Ibuprofen 20-40mg/kg/Tag in 3 Einzeldosen, MTX 10-15mg/m² Körperoberfläche/Woche, Hydrochloroquin 5-7mg/Tag ab 6 Jahren, Leflunomid 100mg/Tag für 3 Tage dann Erhaltungsdosis von 20mg/Tag (zugelassen für systemische JIA und ab 18 Jahren), Azathioprin 1-3mg/kg/Tag in 2-3 Einzeldosen, Sulfasalazin 40-60 mg/kg/Tag in 3-4 Einzeldosen, Prednison 0,2-2mg/kg/Tag, Etanercept 0,4mg/kg subkutan 2x/Woche, Adalimumab 24mg/m² Körperoberfläche bis zu einer maximalen Einzeldosis von 40mg subkutan alle 2 Wochen, Infliximab 5mg/kg alle 8 Wochen intravenös, Tocilizumab 8mg/kg alle 4 Wochen intravenös, Anakinra 100mg/Tag ab 10kg Körpergewicht (48), (49), (50), (51), (52).

4.2 IgG-anti-FSME-Konzentration

Die ELISAs zur Bestimmung der IgG-anti-FSME-Konzentration wurden bei 99 Patienten mit JIA und bei 31 gesunden Kontrollen durchgeführt. Bei einem Patienten stand das abgenommene Serum nicht mehr zur Verfügung, weshalb es nur 99 anstatt 100 Patienten sind. 97 der Patienten und alle 31 der Kontrollen hatten eine IgG-anti-FSME-Konzentration über 165 VIEU/ml, welche als positiv definiert ist. Weiterhin wurde

zwischen normal positiv mit Werten zwischen 165 VIEU/ml und 1000 VIEU/ml und hochpositiv bei Werten über 1000 VIEU/ml unterschieden. Bei den Patienten mit JIA wurde ebenfalls eine negative (<120 VIEU/ml) und eine grenzwertige (120 – 165 VIEU/ml) IgG-anti-FSME-Konzentration festgestellt. Abbildung 10 zeigt die Verteilung der IgG-anti-FSME-Konzentration bei den FSME-geimpften JIA Patienten und gesunden Kontrollen.

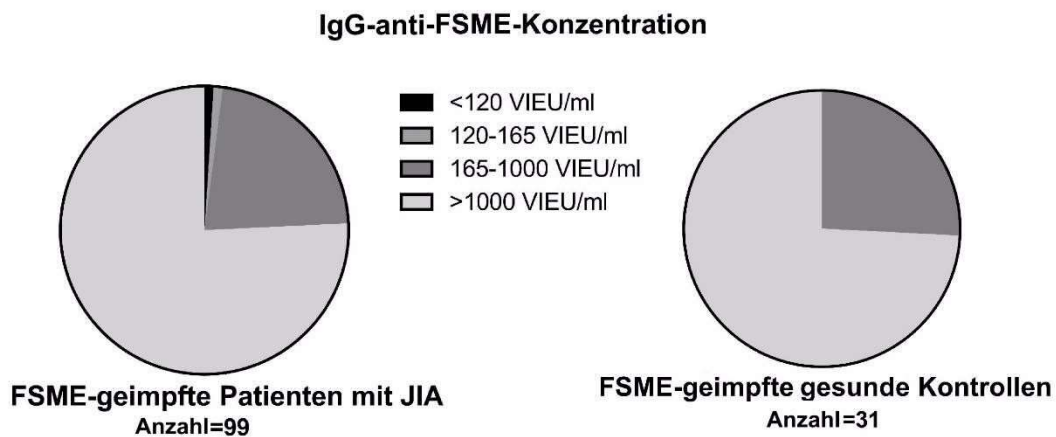


Abbildung 10: Verteilung der IgG-anti-FSME-Konzentration bei FSME-geimpften Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen. Legende: <120 VIEU/ml: negativ, 120-165 VIEU/ml: grenzwertig, 165-1000 VIEU/ml: positiv, >1000 VIEU/ml: hoch positiv.

Die Angabe > 1000 VIEU/ml wurde nicht näher spezifiziert, weshalb diese zur Errechnung des Mittelwerts nicht miteinbezogen wurden. Da die Mehrzahl der Proben hochpositiv war, wäre die Verfälschung erheblich gewesen und der Mittelwert deutlich höher. Statistisch bestand zwischen Patienten und Kontrollen ein Unterschied betreffend der Verteilung der hochpositiven Proben >1000 VIEU/ml.

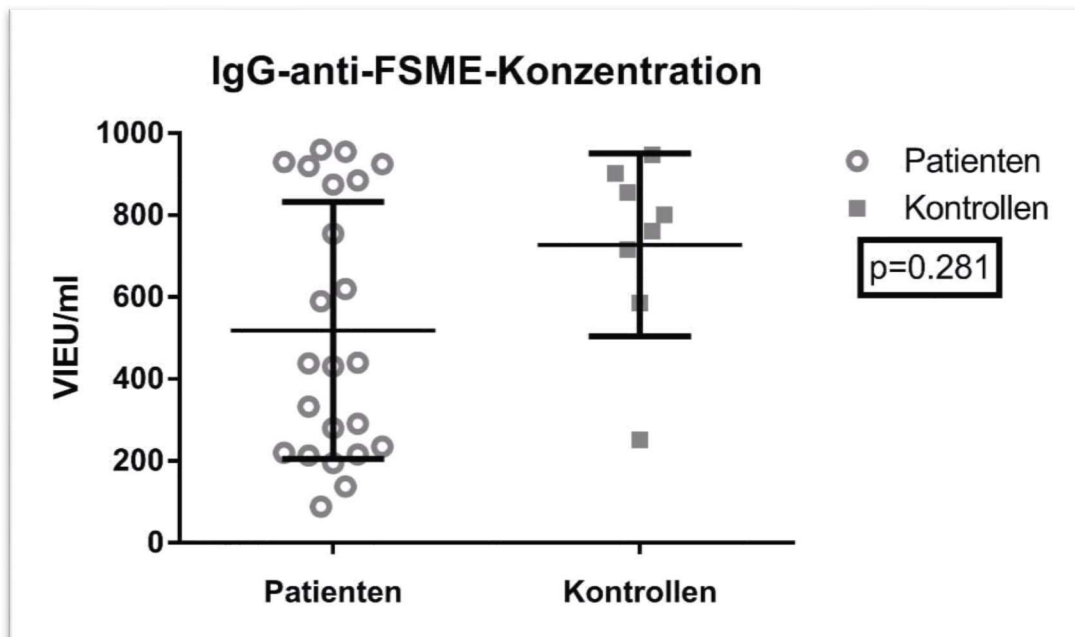


Abbildung 11: Verteilung der Werte in VIEU/ml der Anti-IgG-FSME-Konzentration, die unter 1000 VIEU/ml lagen, bei den Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen. Angabe des Mittelwerts mit Standardabweichung. Der p-Wert (Mann-Whitney-U-Test) zeigt keinen signifikanten Unterschied.

Abbildung 11 zeigt die Verteilung der IgG-anti-FSME-Konzentration bei den Patienten mit JIA und den gesunden Kontrollen in der Gruppe mit Werten <1000 VIEU/ml. Der Mittelwert der IgG-anti-FSME-Konzentration bei diesen Patienten mit JIA lag bei 519 VIEU/ml und bei diesen gesunden Kontrollen bei 728 VIEU/ml.

Dieser Unterschied zeigte sich als statistisch nicht signifikant.

4.2.1 Vergleich der IgG-anti-FSME-Konzentration mit der Anzahl der FSME-Impfungen

Außer Patienten und Kontrollen mit einer vollständigen Grundimmunisierung gegen FSME gab es noch einige Proben von Probanden, deren Impfstatus unbekannt war oder sich im Nachhinein als unvollständig herausstellte.

Bei den Kindern und Jugendlichen mit JIA, die drei oder mehr FSME-Impfungen bekommen hatten, hatten 98% eine positive IgG-anti-FSME-Konzentration, jeweils ein Patient, der 0,01% entspricht, war nur grenzwertig oder negativ. Wenn die Grundimmunisierung nicht vollständig abgeschlossen war oder nur 1-2 Impfungen vorlagen, teilte sich die IgG-anti-FSME-Konzentration gleichmäßig in negativ, grenzwertig und positiv. Bei den drei Patienten mit JIA, die nicht gegen FSME geimpft waren, zeigte sich eine negative IgG-anti-FSME-Konzentration. Außerdem gab es noch drei Patienten mit unbekanntem Impfstatus bezüglich der FSME-Immunsierung. Bei diesen lag eine IgG-anti-FSME-Konzentration von über 165 VIEU/ml vor.

Bei den gesunden Kontrollen lag sowohl bei den 31 mit vollständiger Grundimmunisierung als auch bei denjenigen, die nicht gegen FSME immunisiert waren und bei denen der Impfstatus unbekannt war, eine positive IgG-anti-FSME-Konzentration vor.

Diese Daten sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

FSME-Impfungen	IgG-anti-FSME-Konzentration		
	≥165 VIEU/ml	120-165 VIEU/ml	<120 VIEU/ml
Patienten mit JIA			
unbekannt	3	0	0
> 3 Impfungen	97	1	1
1-2 Impfungen	2	2	2
keine Impfung	0	0	3
Gesunde Kontrollen			
unbekannt	2	0	0
> 3 Impfungen	31	0	0
keine Impfung	2	0	0

Tabelle 14: Kreuztabelle der IgG-anti-FSME-Konzentration und Anzahl der FSME-Impfungen bei Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen. Die Grundimmunisierung ist nach 3 Impfungen abgeschlossen. Eine IgG-anti-FSME-Konzentration von <120 VIEU/ml wird als negativ gewertet, bei 120-165 VIEU/ml als grenzwertig und bei ≥165 VIEU/ml als positiv.

Bei den Patienten mit JIA war es wahrscheinlicher eine IgG-anti-FSME-Konzentration ≥165 VIEU/ml ($p=0,016$) zu haben, wenn sie Boosterimpfungen erhalten hatten, als wenn sie keine bekommen hatten. Niedrigere IgG-anti-FSME-Konzentrationen korrelierten bei den gesunden Kontrollen mit einer längeren Zeit zwischen der Grundimmunisierung und der ersten Boosterimpfung ($p=0,010$).

In Abbildung 12 ist der Vergleich von Mittelwerten der IgG-anti-FSME-Konzentrationen von JIA-Patienten und gesunden Kontrollen bei einer verschiedenen Anzahl von FSME-Impfungen abgebildet. Bei einer vollständigen Grundimmunisierung oder bei Vorliegen einer Boosterimpfung war die IgG-anti-FSME-Konzentration bei den Patienten mit JIA niedriger als bei den gesunden Kontrollen. Beim Vorliegen von zwei Boosterimpfungen war es umgekehrt. Dieser Unterschied zeigte sich als nicht statistisch signifikant.

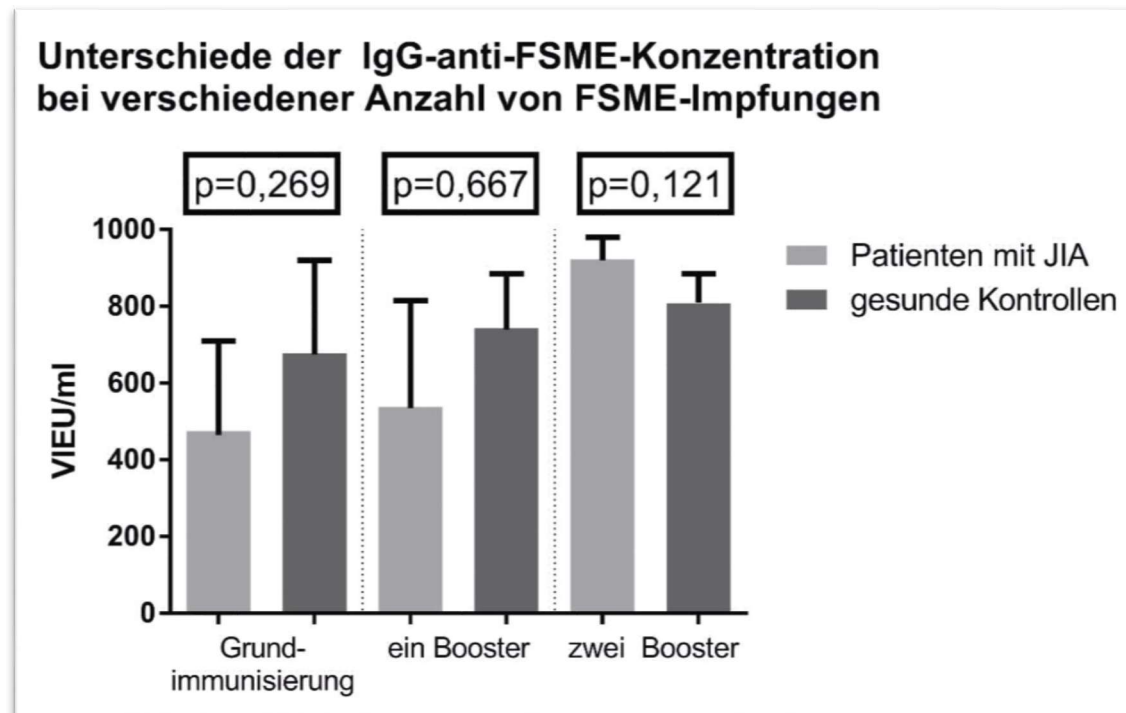


Abbildung 12: Vergleich der IgG-anti-FSME-Konzentration von Patienten mit JIA und gesunden Kindern bei verschiedener Anzahl von FSME-Impfungen. Die Grundimmunisierung ist mit 3 Teilimpfungen gegen FSME abgeschlossen. Angabe der Mittelwerte sowie der Standardabweichung. Die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied. Hoch-positive IgG-anti-FSME-Konzentrationen >1000 VIEU/ml wurden wegen Verzerrung des Mittelwertes nicht miteinbezogen. (Abkürzungen: JIA = Juvenile idiopathische Arthritis, VIEU = Vienna International Units).

Abbildung 13 zeigt die Mittelwerte der IgG-anti-FSME-Konzentrationen von JIA-Patienten bei verschiedener Krankheitsaktivität. Bei der primären Impfung gegen FSME war der Unterschied zwischen Patienten mit bereits gestellter JIA Diagnose und zu der Zeit noch gesunden Patienten nur gering, mit einer etwas höheren IgG-anti-FSME-Konzentration der gesunden Patienten. Im Gegensatz dazu war die IgG-anti-FSME-Konzentration der Patienten mit JIA Diagnose bei der Boosterimpfung mit 748 VIEU/ml deutlich höher als die der noch gesunden Patienten mit 403 VIEU/ml. Dies ist bei $p=0,117$ jedoch nicht statistisch signifikant.

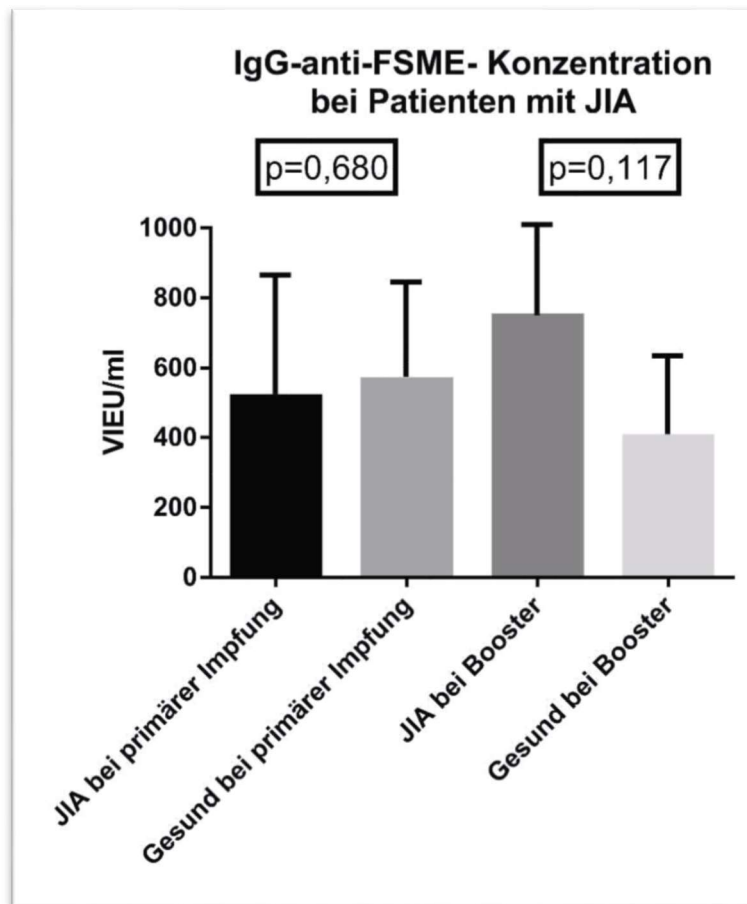


Abbildung 13: IgG-anti-FSME-Konzentration der JIA Patienten bei verschiedenem Krankheitsstatus. Verglichen wurden die Mittelwerte bei der primären Impfung bzw. bei Boosterimpfung zwischen Patienten mit bereits gestellter JIA Diagnose und zu dem Zeitpunkt noch gesunden Kindern und Jugendlichen. Angabe der Mittelwerte sowie der Standardabweichung. Die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied. Hochpositive IgG-anti-FSME-Konzentrationen >1000 VIEU/ml wurden wegen Verfälschung des Mittelwertes nicht miteinbezogen. (Abkürzungen: JIA = Juvenile idiopathische Arthritis, VIEU = Vienna International Units).

4.2.2 Einfluss der Medikation auf die IgG-anti-FSME-Konzentration

Eine Therapie mit Methotrexat bei den Patienten mit JIA hatte einen Einfluss auf die IgG-anti-FSME-Konzentration. Dies wurde in Abbildung 14 dargestellt. Zum Zeitpunkt der primären Impfung ($p=0,281$) war der Mittelwert der IgG-anti-FSME-Konzentration bei denjenigen Patienten, die MTX nahmen, niedriger als bei denen, die keine Therapie mit MTX erhielten. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme ($p=0,254$) war es umgekehrt und diejenigen, die Methotrexat-Therapie bekamen, zeigten eine höhere IgG-anti-FSME-Konzentration. Der Unterschied war bei beiden Gruppen nicht statistisch signifikant.

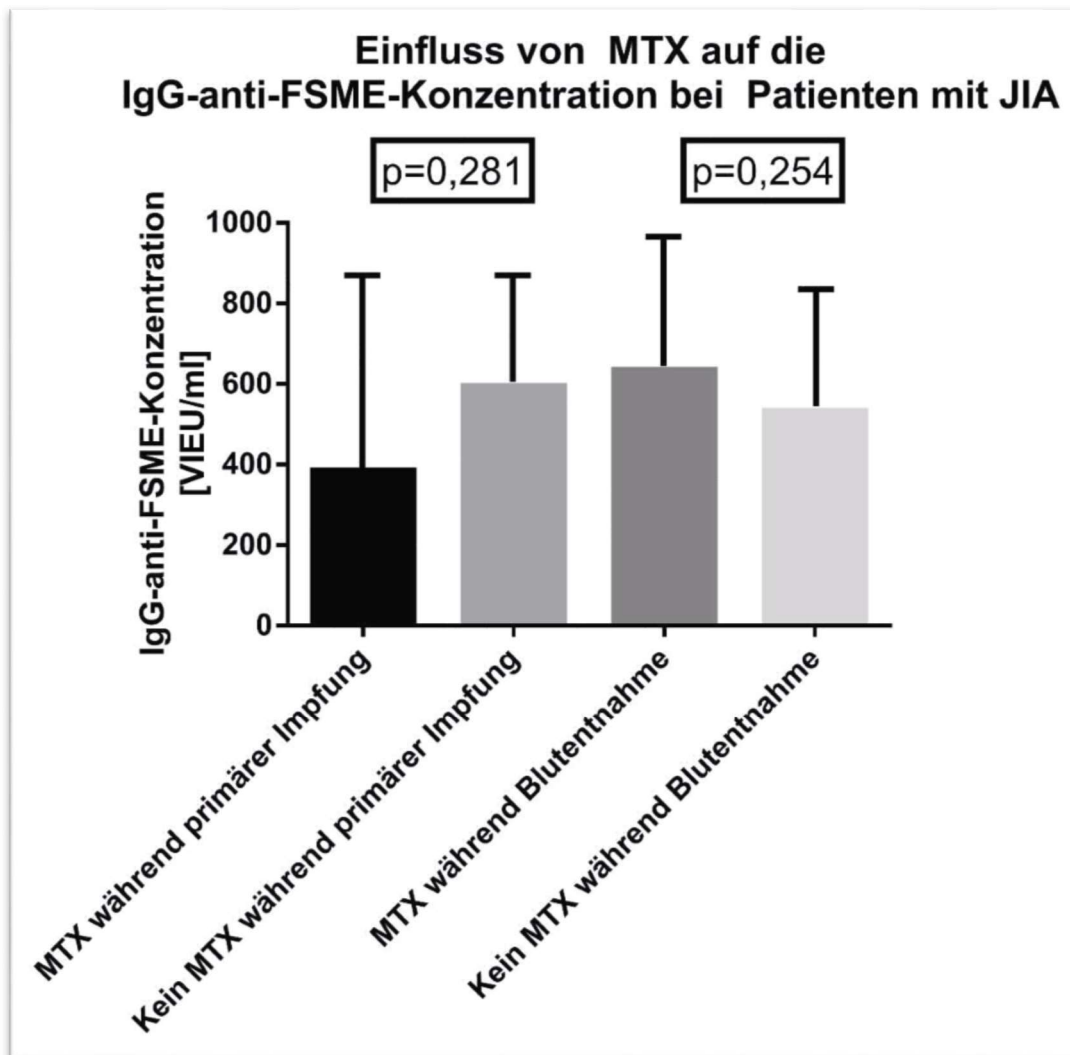


Abbildung 14: Einfluss von MTX auf die IgG-anti-FSME-Konzentration bei Patienten mit JIA. Vergleich der Mittelwerte bei einer Therapie mit bzw. ohne MTX während der primären FSME-Impfung und dem Zeitpunkt der Blutentnahme. Angabe der Mittelwerte sowie der Standardabweichung. Die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied. Hoch-positive IgG-anti-FSME-Konzentrationen >1000 VIEU/ml wurden wegen Verfälschung des Mittelwertes nicht miteinbezogen. (Abkürzungen: MTX = Methotrexat, JIA = Juvenile idiopathische Arthritis, VIEU = Vienna International Units)

In Abbildung 15 wurde der Einfluss der Therapie mit TNF α -Blockern auf die IgG-anti-FSME-Konzentration bei Patienten mit JIA dargestellt, hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

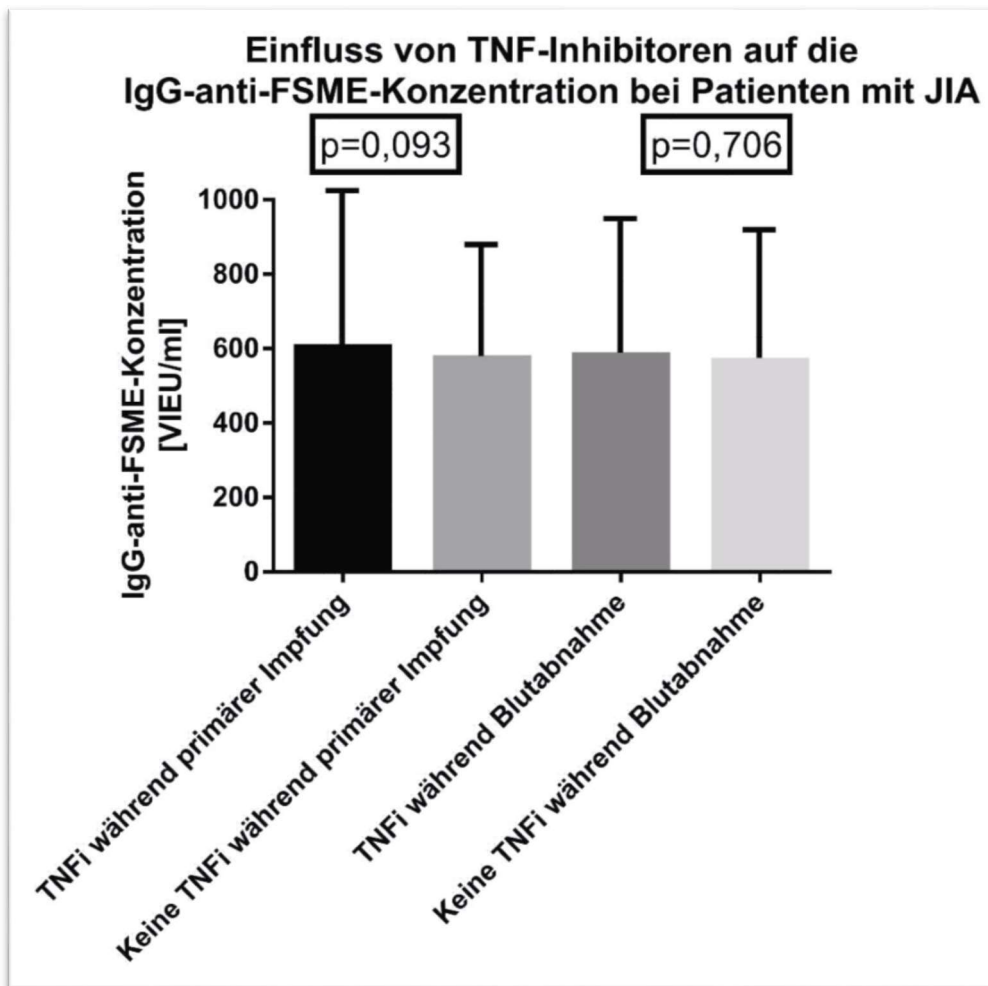


Abbildung 15: Einfluss von TNF α -Inhibitoren auf die IgG-anti-FSME-Konzentration bei Patienten mit JIA. Vergleich der Mittelwerte bei einer Therapie mit bzw. ohne TNF α -Inhibitor während der primären FSME-Impfung und dem Zeitpunkt der Blutentnahme. Angabe der Mittelwerte sowie der Standardabweichung. Die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied. Hoch-positive IgG-anti-FSME-Konzentrationen >1000 VIEU/ml wurden wegen Verfälschung des Mittelwertes nicht miteinbezogen. (Abkürzungen: TNFi = TNF α -Inhibitor, JIA = Juvenile idiopathische Arthritis, VIEU = Vienna International Units)

4.3 IgG-anti-FSME-Avidität

Für den ELISA zur Bestimmung der IgG-anti-FSME-Avidität wurden die gleichen 99 Patienten mit JIA und 31 gesunde Kontrollen wie bei der IgG-anti-FSME-Konzentration getestet. Trotz des einen Patienten mit negativer Anti-IgG-FSME-Konzentration war die IgG-anti-FSME-Avidität bei keinem der Patienten negativ. In fast 95% der Fälle war die IgG-anti-FSME-Avidität bei den Patienten mit JIA und bei den gesunden Kontrollen sogar mit 100% der Fälle hoch avide (relativer Aviditätsindex RAI > 60%). Die Verteilung ist in Abbildung 16 dargestellt.

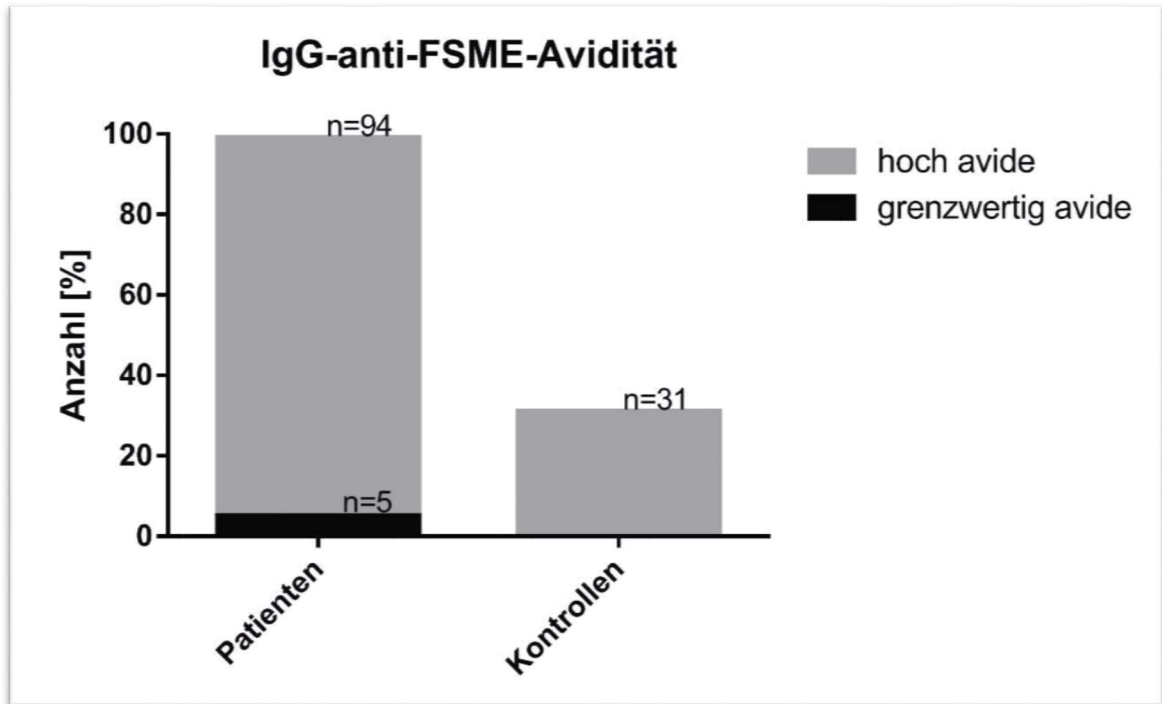


Abbildung 16: Aufteilung der IgG-anti-FSME-Avidität bei FSME-geimpften Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen. Als grenzwertig avide war ein RAI 40-60% und für hoch avide ein RAI>60% definiert. (RAI=relativer Aviditätsindex)

Als Mittelwert des RAI bei Kindern und Jugendlichen mit JIA wurden 81,3% ermittelt. Die Verteilung ist in Abbildung 17 zu sehen. Bei den gesunden Kontrollen liegt der Mittelwert der IgG-anti-FSME-Avidität bei 86,4%. Bei einem p-Wert von 0,027 wurden diese Werte als signifikant gewertet.

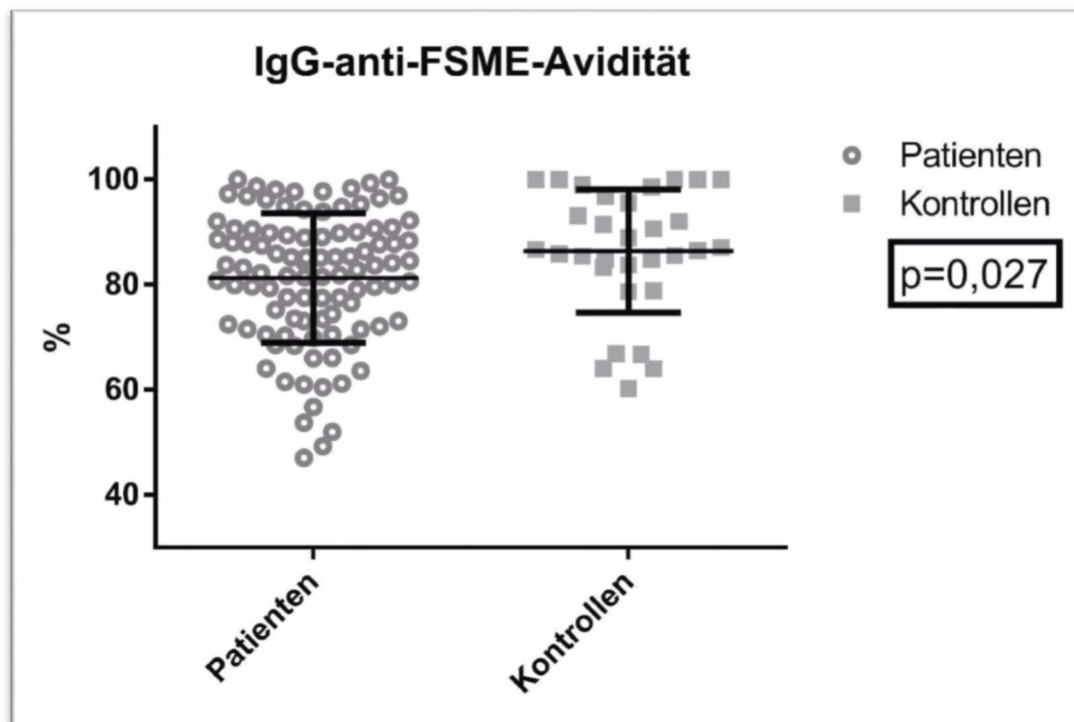


Abbildung 17: Verteilung des relativen Aviditätsindex der IgG-anti-FSME-Avidität bei Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen. Darstellung der IgG-anti-FSME-Avidität im relativen Aviditätsindex (RAI in %). Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung. Der p-Wert (Mann-Whitney-U-Test) zeigt mit 0.027 einen statistisch signifikanten Unterschied.

4.3.1 Vergleich der IgG-anti-FSME-Avidität mit der Anzahl der FSME-Impfungen

Da dieselben Proben für die IgG-anti-FSME-Avidität wie –Konzentration benutzt wurden, waren ebenfalls Probanden dabei, bei denen die Grundimmunisierung gegen FSME nicht vollständig oder der Impfstatus unbekannt war.

Wie in Tabelle 15 zu sehen, waren bei den Kindern und Jugendlichen mit juveniler idiopathischer Arthritis 95% derjenigen, die eine vollständige Grundimmunisierung hatten, mit einer IgG-anti-FSME-Avidität von über 60% hoch avide. Die restlichen fünf Patienten waren intermediär avide. Wie schon bei der IgG-anti-FSME-Konzentration zeigte sich bei denjenigen mit 1-2 FSME-Impfungen eine gleichmäßige Aufteilung in negative, intermediär und hoch avide. Das Gleiche galt ebenfalls für die Patienten ohne Immunisierung gegen FSME. Bei den JIA Patienten mit unbekanntem Impfstatus waren zwei Drittel hoch avide und ein Drittel intermediär avide.

Bei der gesunden Kontrollpopulation waren alle mit über drei Impfungen hoch avide. War keine Impfung gegen FSME vorhanden, zeigte sich bei 50% eine IgG-anti-FSME-

Avidität von >60% und die anderen Hälfte war intermediär avide. Die zwei Kontrollen, deren Impfstatus nicht bekannt war, zeigten eine hohe Avidität.

FSME Impfungen	IgG-anti-FSME-Avidität		
	>60%	40-60%	<40%
Patienten mit JIA			
unbekannt	2	1	0
> 3 Impfungen	94	5	0
1-2 Impfungen	2	2	2
keine Impfung	1	1	1
gesunden Kontrollen			
unbekannt	2	0	0
> 3 Impfungen	31	0	0
keine Impfung	1	1	0

Tabelle 15: Kreuztabelle der IgG-anti-FSME-Avidität und Anzahl der FSME-Impfungen bei Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen. Die Grundimmunisierung ist bei 3 Impfungen abgeschlossen. Eine IgG-anti-FSME-Avidität von <40% wird als negativ gewertet, bei 40-60% als intermediär und bei ≥60% als hoch avide.

Bei den Patienten mit JIA war es wahrscheinlicher eine IgG-anti-FSME-Avidität mit RAI>60% (p=0,021) zu haben, wenn sie Boosterimpfungen erhalten hatten, als wenn sie keine bekommen hatten.

Abbildung 18 zeigt den Vergleich von Mittelwerten der IgG-anti-FSME-Avidität von JIA-Patienten und gesunden Kontrollen bei einer verschiedenen Anzahl von FSME-Impfungen. Patienten mit JIA hatten unabhängig davon, wie viele Impfungen sie bekommen hatte, immer eine niedrigere IgG-anti-FSME-Avidität als die gesunden Kontrollprobanden. Mit p=0,032 war dies aber nur bei der Gruppe mit einer Boosterimpfung statistisch signifikant.

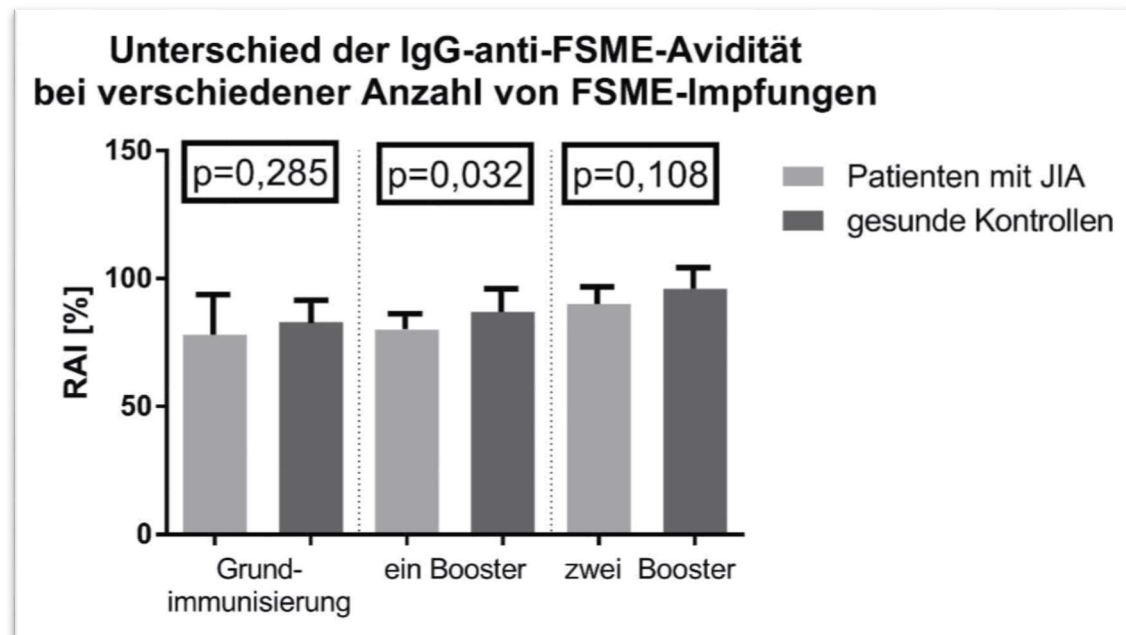


Abbildung 18: Vergleich der IgG-anti-FSME-Avidität von Patienten mit JIA und gesunden Kindern bei verschiedener Anzahl von FSME-Impfungen. Die Grundimmunisierung ist mit 3 Teilimpfungen gegen FSME abgeschlossen. Angabe der Mittelwerte sowie der Standardabweichung. Nur der p-Wert (Mann-Whitney-U-Test) in der Gruppe mit einer Boosterimpfung zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied. (Abkürzungen: JIA = Juvenile idiopathische Arthritis, RAI = relativer Aviditätsindex)

Zum Zeitpunkt der primären Impfung gegen FSME und bei der Boosterimpfung wurden die JIA-Patienten jeweils in zwei Gruppen aufgeteilt: diejenigen, die zu dem Zeitpunkt bereits die Diagnose JIA gestellt bekommen hatte und diejenigen, die noch gesund waren. In Abbildung 19 ist der Mittelwert der IgG-anti-FSME-Avidität bei diesen Gruppen aufgezeigt. Bei der primären Impfung gegen FSME war die IgG-anti-FSME-Avidität bei den gesunden Patienten ein wenig höher als bei denjenigen, die bereits die JIA Diagnose erhalten hatten. Zum Zeitpunkt der Boosterimpfung war die IgG-anti-FSME-Avidität mit einem RAI von 83% in beiden Gruppen gleich.

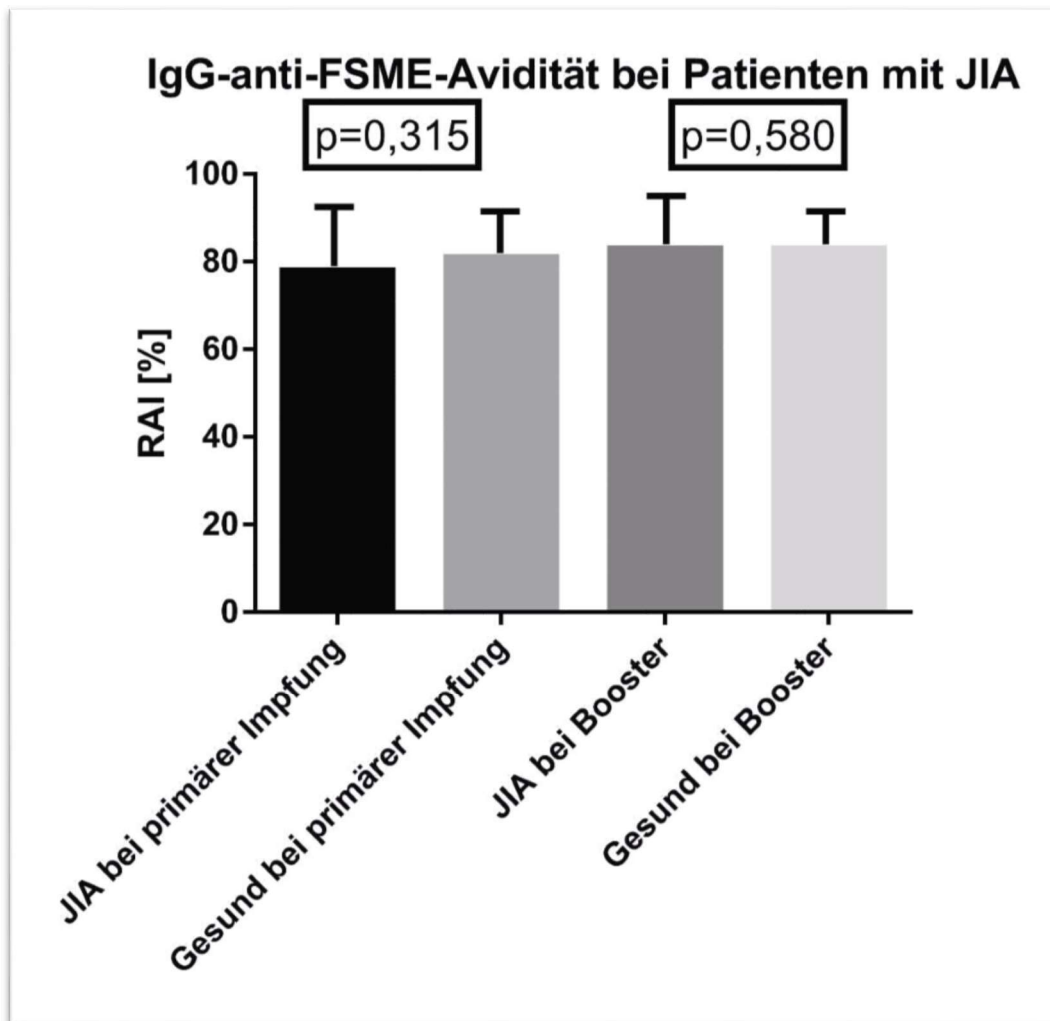


Abbildung 19: IgG-anti-FSME-Avidität der JIA Patienten bei verschiedenem Krankheitsstatus. Verglichen wurden die Mittelwerte bei der primären Impfung bzw. bei Boosterimpfung zwischen Patienten mit bereits gestellter JIA Diagnose und zu dem Zeitpunkt noch gesunden Kindern und Jugendlichen. Angabe der Mittelwerte sowie der Standardabweichung. Die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied. (Abkürzungen: JIA = Juvenile idiopathische Arthritis, RAI = relativer Aviditätsindex)

4.3.2 Einfluss der Medikation auf die IgG-anti-FSME-Avidität

Eine Therapie mit Methotrexat hatte einen negativen Einfluss auf die IgG-anti-FSME-Avidität. Sowohl bei der primären FSME-Impfung ($p=0,001$) als auch zum Zeitpunkt der Blutentnahme ($p=0,096$) war die IgG-anti-FSME-Avidität niedriger im Vergleich zu denjenigen Patienten, die keine Therapie mit MTX erhielten. Dies ist in Abbildung 20 zu sehen.

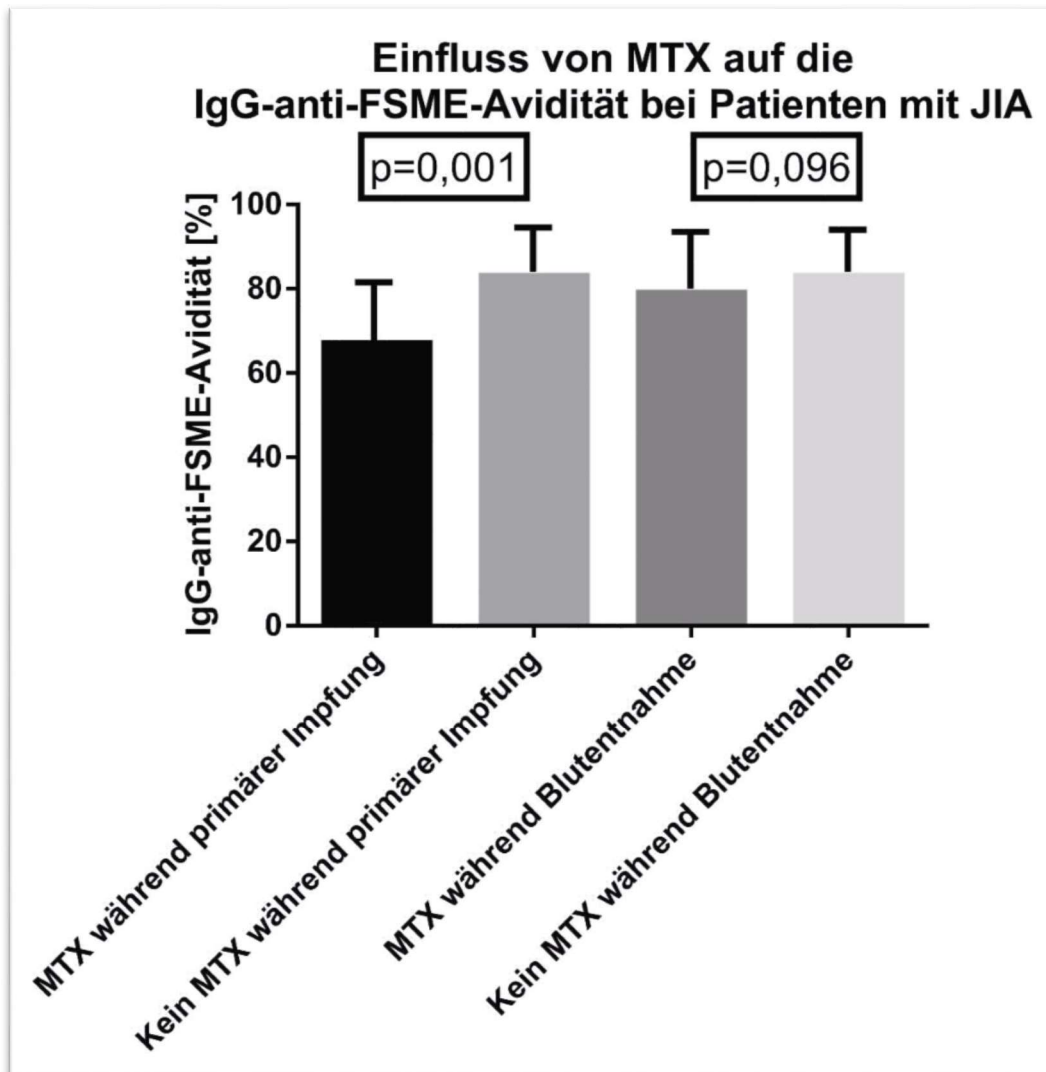


Abbildung 20: Einfluss von MTX auf die IgG-anti-FSME-Avidität bei Patienten mit JIA. Vergleich der Mittelwerte bei einer Therapie mit bzw. ohne MTX während der primären FSME-Impfung und dem Zeitpunkt der Blutentnahme. Angabe der Mittelwerte sowie der Standardabweichung. Der p-Wert (Mann-Whitney-U-Test) bei denjenigen Patienten, welche zum Zeitpunkt der primären Impfung MTX erhielten, zeigte mit 0,001 einen statistisch signifikanten Unterschied. (Abkürzungen: MTX = Methotrexat, JIA = Juvenile idiopathische Arthritis, RAI = relativer Aviditätsindex)

Auch eine Therapie mit TNF α -Inhibitoren zeigte einen nicht signifikanten negativen Effekt auf die IgG-anti-FSME-Avidität, siehe Abbildung 21.

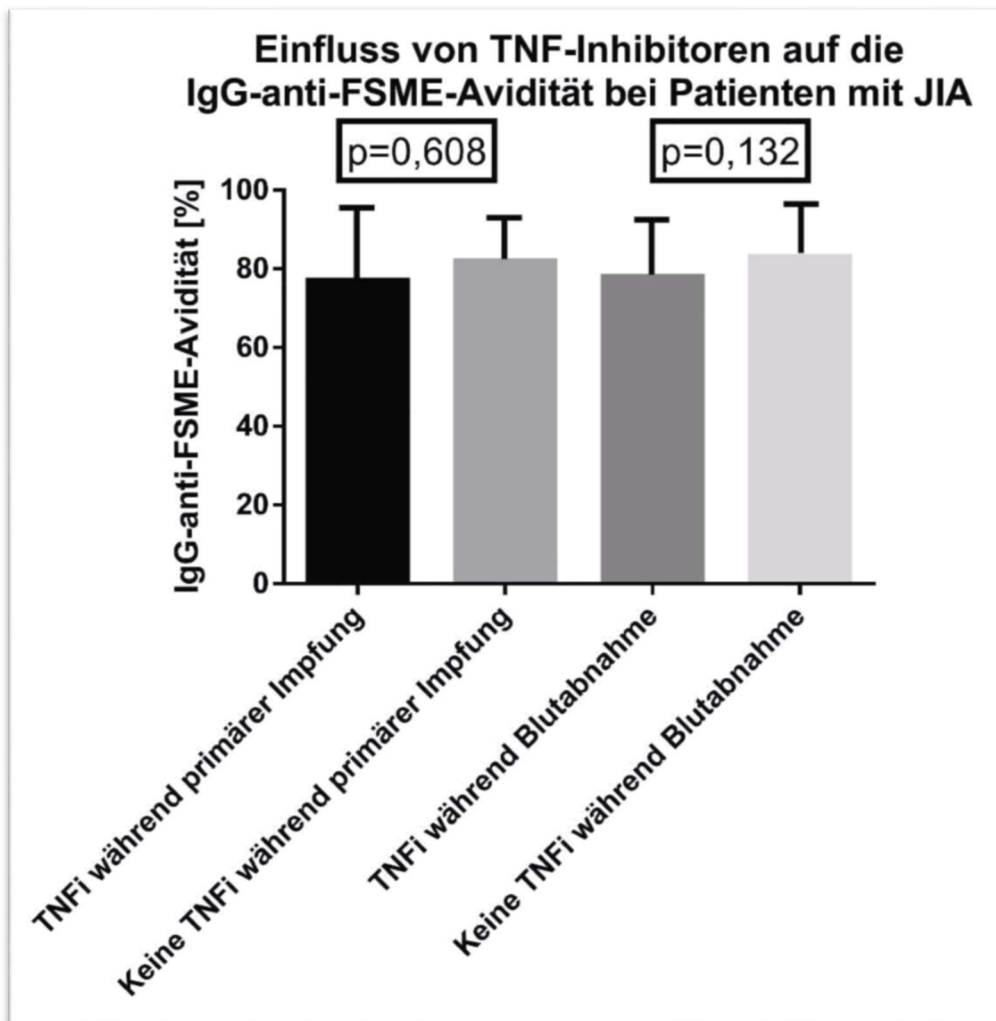


Abbildung 21: Einfluss von TNF α -Inhibitoren auf die IgG-anti-FSME-Avidität bei Patienten mit JIA. Vergleich der Mittelwerte bei einer Therapie mit bzw. ohne TNF α -Inhibitoren während der primären FSME-Impfung und dem Zeitpunkt der Blutentnahme. Angabe der Mittelwerte sowie der Standardabweichung. Die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied. (Abkürzungen: TNFi = TNF α -Inhibitor, JIA = Juvenile idiopathische Arthritis, RAI = relativer Aviditätsindex)

4.3.3 Korrelation von IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität

Tabelle 16 ist eine Kreuztabelle zur Veranschaulichung der Zusammenhänge zwischen der IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität. Patienten und Kontrollen werden nicht einzeln aufgeführt. Es handelt sich nur um die Probanden, die drei oder mehr Impfungen gegen FSME erhalten hatten. Etwa 97% der positiven und hochpositiven IgG-anti-FSME-Konzentrationen haben eine hoch avide IgG-anti-FSME-Avidität. Während die Probe mit grenzwertiger IgG-anti-FSME-Konzentration ebenfalls hoch avide Antikörper aufweist, waren bei der Probe mit negativer IgG-anti-FSME-Konzentration nur grenzwertig avide Antikörper nachweisbar.

			IgG-anti-FSME-Avidität		Gesamt
			>60%	40-60%	
IgG-anti-FSME-Konzentration [VIEU/ml]	≥165	n	124	4	128
		%	97%	3%	100%
	120-165	n	1	0	1
		%	100%	0%	100%
<120	n	0	1	1	
	%	0%	100%	100%	
Gesamt	n	125	5	130	
	%	96%	4%	100,00%	

Tabelle 16: Kreuztabelle der IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität. Die IgG-anti-FSME-Konzentration war bei ≥165 VIEU/ml positiv, bei 120-165 VIEU/ml grenzwertig und bei <120 VIEU/ml negativ. Die FSME-Antikörper waren bei einem RAI >60% hoch avide und bei 40-60% intermediär avide, bei RAI <40% war die Anti-IgG-Avidität negativ.

Die Korrelation zwischen der IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität sind jedoch nicht statistisch signifikant, wie in Abbildung 22 zu sehen ist.

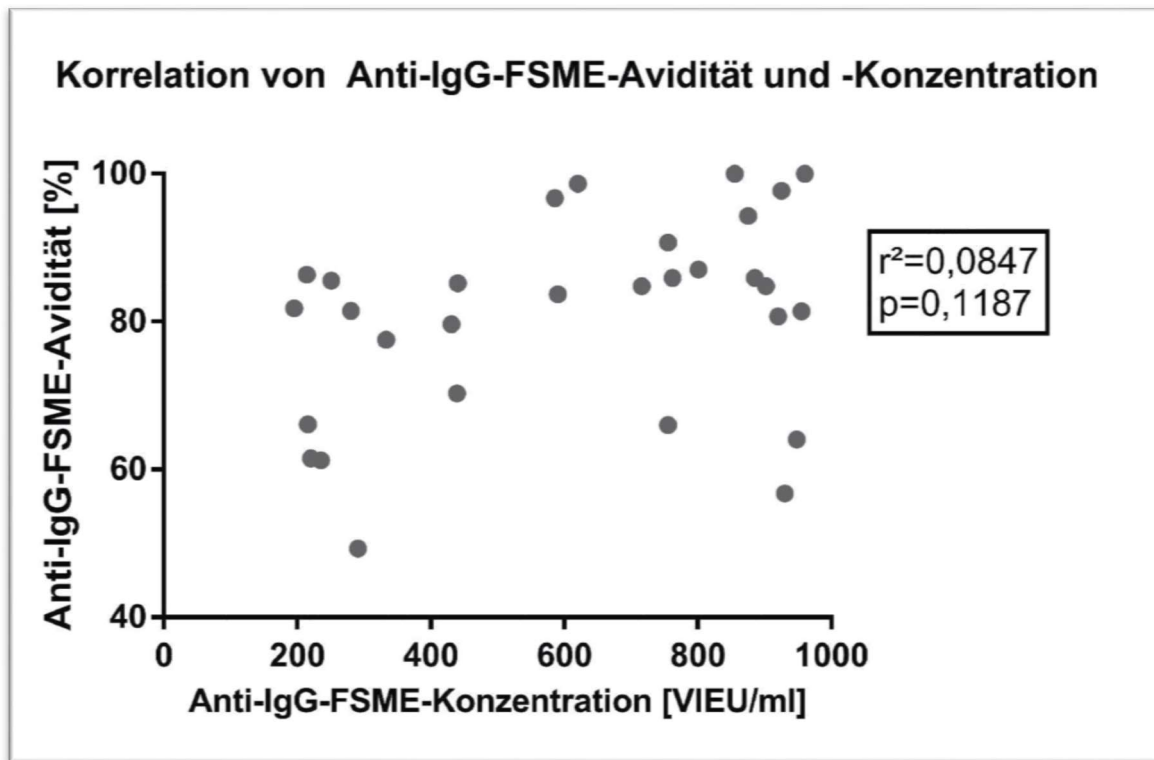


Abbildung 22: Korrelation zwischen der IgG-anti-FSME-Avidität und –Konzentration. Diese ist bei $p=0,1187$ und $r^2=0,0847$ nach der Spearman Rank Korrelation nicht signifikant.

4.4 Neutralisationstest

Der Neutralisationstest wurde nur bei Proben durchgeführt, deren IgG-anti-FSME-Konzentration nicht negativ war. Insgesamt wurde per Zufallsauswahl bei 26 Patienten und bei 11 Kontrollen ein Neutralisationstiter durchgeführt. Bei 88,5% der Kinder und Jugendlichen mit JIA war der Neutralisationstiter mit >1:10 positiv, während bei den gesunden Kontrollen alle Proben als positiv gewertet wurden.

Der Median der Titerwerte lag für die Patienten mit JIA bei 80 und bei den Kontrollen bei 160. In Abbildung 23 ist die Verteilung der Neutralisationstiter bei den JIA Patienten und den gesunden Kontrollen aufgezeigt. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

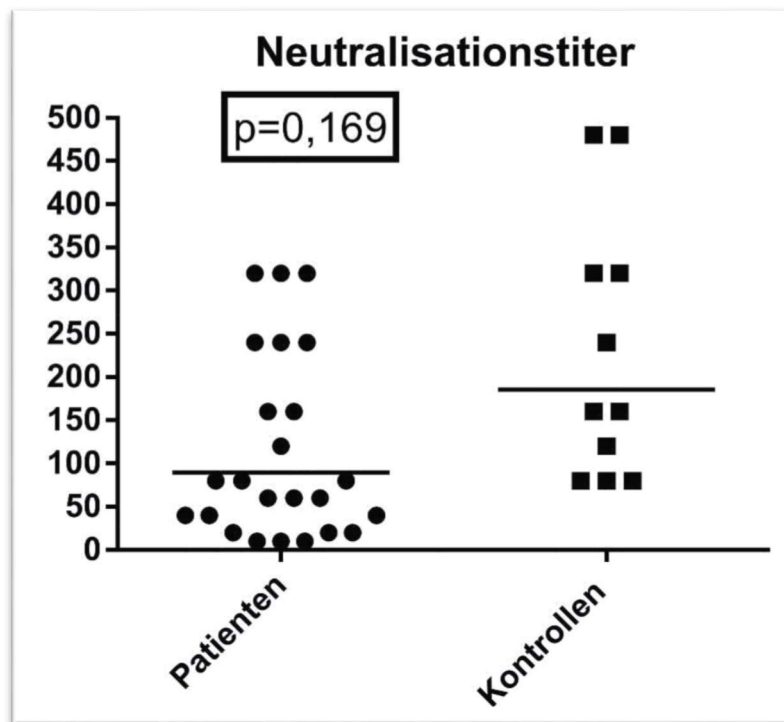


Abbildung 23: Verteilung der FSME-Neutralisationstiter bei FSME-geimpften Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen. Angabe des Medians. Der p-Wert (Mann-Whitney-U-Test) zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

4.4.1 Vergleich der Neutralisationstiter mit der Anzahl der FSME-Impfungen

Wie in Tabelle 17 zu sehen, hatten alle JIA Patienten mit positivem Neutralisationstiter eine vollständige Grundimmunisierung gegen FSME. Bei vier Patienten (15%) war der

Neutralisationstiter aber trotz drei FSME-Impfungen negativ. Dies war ebenfalls für den einen Patienten mit unbekanntem Impfstatus so.

Bei den gesunden Kontrollen hatten sowohl alle mit vollständiger Grundimmunisierung als auch die zwei mit unbekanntem Impfstatus einen positiven Neutralisationstiter mit >10.

FSME Impfungen	Neutralisationstiter	
	>10	<10
Patienten mit JIA		
unbekannt	0	1
> 3 Impfungen	23	4
gesunde Kontrollen		
unbekannt	2	0
> 3 Impfungen	11	0

Tabelle 17: Kreuztabelle der Anti-IgG-FSME-Avidität und Anzahl der FSME-Impfungen bei Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen. Die Grundimmunisierung ist bei 3 Impfungen abgeschlossen. Ein Neutralisationstiter von >10 wurde als positiv und von <10 als negativ gewertet.

Eine längere Zeit zwischen der Grundimmunisierung und der ersten Boosterimpfung ($p=0,026$) sowie die Zeit seit dem zweiten Booster ($p=0,005$) hatte eine negative Auswirkung auf die Neutralisationstiter bei den Patienten mit JIA nicht jedoch bei den gesunden Kontrollprobanden.

Der Neutralisationstiter bei den JIA-Patienten war sowohl nach der Grundimmunisierung ($p=0,491$) als auch nach einer Boosterimpfung ($p=0,071$) nicht signifikant niedriger als bei den gesunden Kontrollen. Die ist in Abbildung 24 zu sehen. Bei dem Vorhandensein von zwei Boosterimpfungen hatten sowohl die Patienten als auch die gesunden Kontrollen einen Neutralisationstiter von 120.

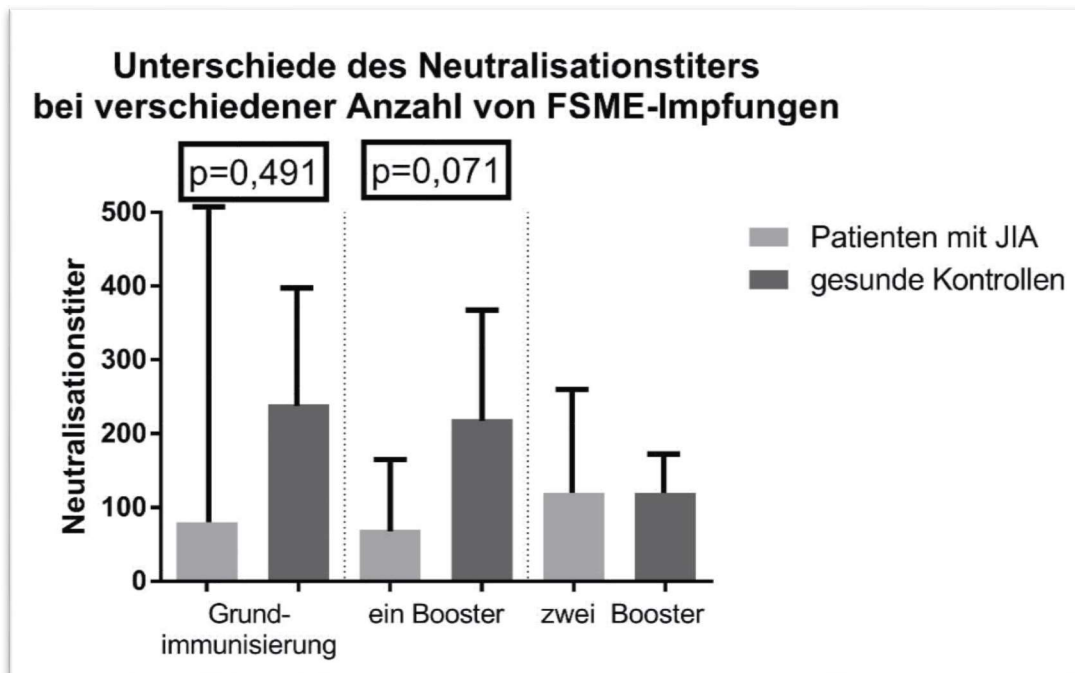


Abbildung 24: Vergleich der Neutralisationstiter von Patienten mit JIA und gesunden Kindern bei verschiedener Anzahl von FSME-Impfungen. Die Grundimmunisierung ist mit 3 Teilimpfungen gegen FSME abgeschlossen. Es ist jeweils der Median mit Standardabweichung der Neutralisationstiter abgebildet. Die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied. (Abkürzungen: JIA = Juvenile idiopathische Arthritis, FSME = Frühsommer-Meningoenzephalitis)

Die Krankheit JIA hatte einen negativen Einfluss auf die Neutralisationstiter. Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, war der Neutralisationstiter deutlich niedriger, wenn die Patienten zum Zeitpunkt der primären Impfung gegen FSME ($p=0,107$) als auch bei der Boosterimpfung ($p=0,011$) bereits an JIA erkrankt waren.

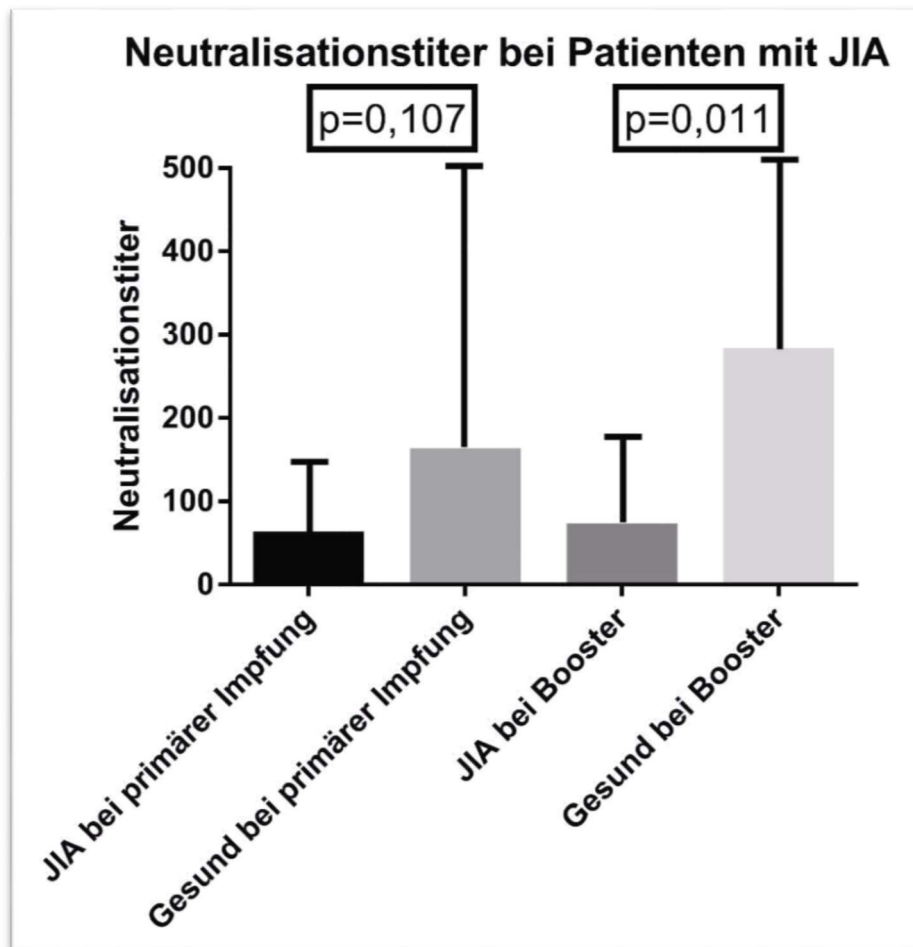


Abbildung 25: Neutralisationstiter der JIA Patienten bei verschiedenem Krankheitsstatus. Verglichen wurden die Mediane bei der primären Impfung bzw. bei Boosterimpfung zwischen Patienten mit bereits gestellter JIA Diagnose und zu dem Zeitpunkt noch gesunden Kindern und Jugendlichen. Angabe der Mediane sowie der Standardabweichung. Der p-Wert (Mann-Whitney-U-Test) bei der Boosterimpfung zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied. (Abkürzung: JIA = Juvenile idiopathische Arthritis)

4.4.2 Einfluss der Medikation auf die Neutralisationstiter

Eine Medikation mit Methotrexat als auch TNF α -Blockern hatte einen negativen Einfluss auf die Neutralisationstiter. Abbildung 26 zeigt den Einfluss von MTX auf die Neutralisationstiter. Diese waren bei einer Therapie mit MTX niedriger als ohne Einnahme von MTX, die Werte waren jedoch nicht statistisch signifikant.

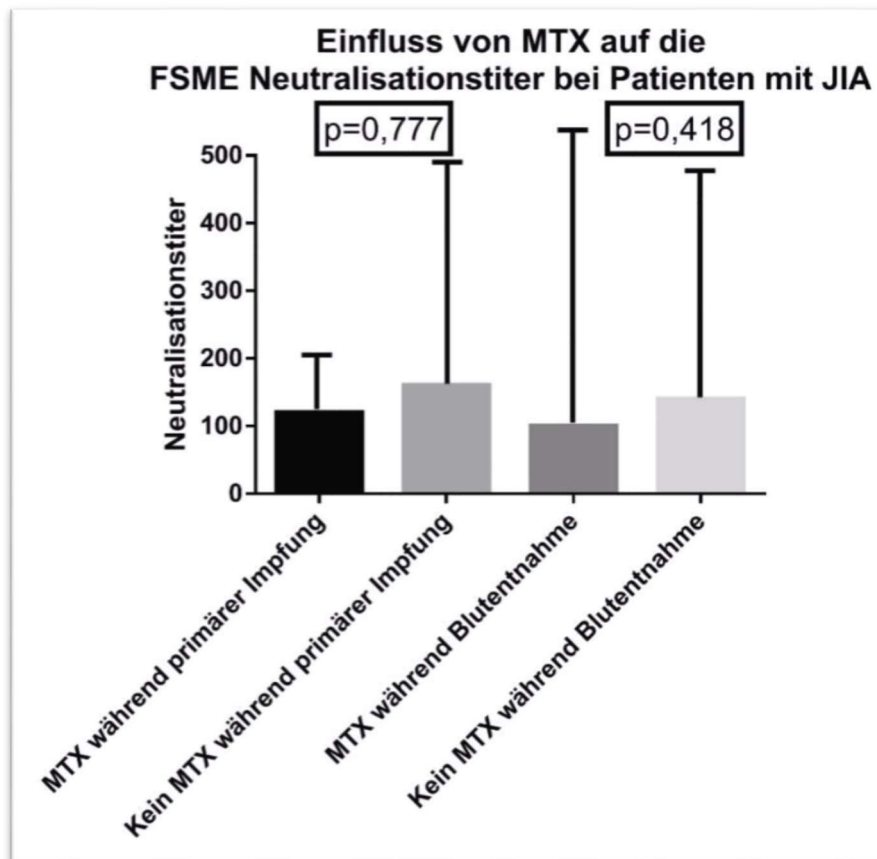


Abbildung 26: Einfluss von MTX auf die Neutralisationstiter bei Patienten mit JIA. Vergleich der Mediane bei einer Therapie mit bzw. ohne MTX während der primären FSME-Impfung und dem Zeitpunkt der Blutentnahme. Angabe der Mediane sowie der Standardabweichung. Die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied. (Abkürzungen: MTX = Methotrexat, JIA = Juvenile idiopathische Arthritis)

In Abbildung 27 ist der Einfluss von TNF α -Inhibitoren auf die Neutralisationstiter gezeigt. Hier waren die Neutralisationstiter bei Therapie mit TNF α -Inhibitoren während der primären Impfung ($p=0,050$) als auch bei der Boosterimpfung gegen FSME ($p=0,040$) statistisch signifikant niedriger als ohne TNF α -Blocker Therapie.

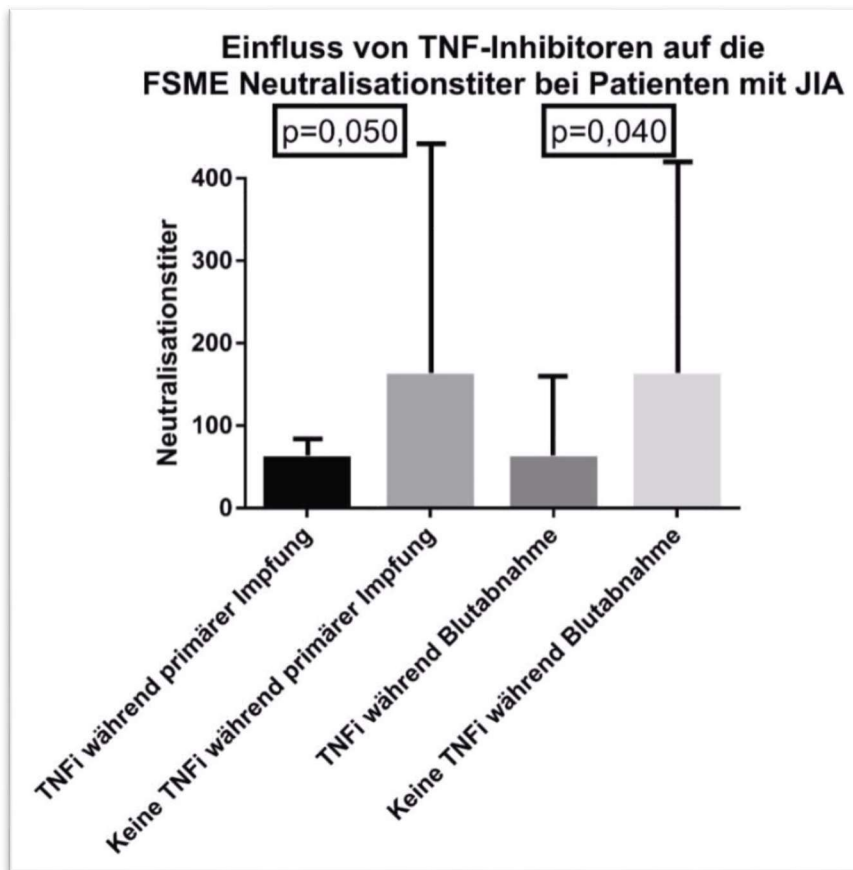


Abbildung 27: Einfluss von TNF α -Inhibitoren auf die Neutralisationstiter bei Patienten mit JIA. Vergleich der Mediane bei einer Therapie mit bzw. ohne TNF α -Inhibitoren während der primären FSME-Impfung und dem Zeitpunkt der Blutentnahme. Angabe der Mittelwerte sowie der Standardabweichung. Die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test) zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied. (Abkürzungen: TNFi = TNF α -Inhibitor, JIA = Juvenile idiopathische Arthritis)

4.4.3 Korrelation des Neutralisationstiter mit der IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität

Bei den Patienten mit JIA hatten 88.5% mit positiver IgG-anti-FSME-Konzentration auch einen positiven Neutralisationstiter. Von den 26 Proben waren 92% hoch avide und wie in Tabelle 18 zu sehen hatten von diesen wiederum 87.5% auch einen positiven Neutralisationstiter. Drei Kinder und Jugendliche mit JIA zeigten trotz einer positiven IgG-anti-FSME-Konzentration und einer hohen IgG-anti-FSME-Avidität einen negativen Neutralisationstiter auf.

In Tabelle 18 ist ebenso der Vergleich mit den gesunden Kindern und Jugendlichen aufgezeigt. Bei den gesunden Kontrollprobanden wurden bei allen, bei denen ein Neutralisationstest durchgeführt wurde, eine hohe IgG-anti-FSME-Avidität und eine positive IgG-anti-FSME-Konzentration festgestellt.

Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Neutralisationstiter und der IgG-anti-FSME-Konzentration konnte sowohl bei den Patienten mit JIA als auch den gesunden Kontrollen nachgewiesen werden, nicht signifikant war jedoch eine Korrelation zwischen dem Neutralisationstiter und der IgG-anti-FSME-Avidität jeweils bei den Patienten und den Kontrollen.

		<u>Neutralisationstiter</u>		<u>p-Wert</u>	
		NT < 10	NT > 10		
Patienten mit JIA					
<u>IgG-anti-FSME-Konzentration</u>	≥165 VIEU/ml	n	3	23	0.0001
		%	11.5%	88.5%	
<u>IgG-anti-FSME-Avidität</u>	>60%	n	3	21	0.542
		%	12.5%	87.5%	
	40-60%	n	0	2	
		%	0%	100%	
gesunden Kontrollen					
<u>IgG-anti-FSME-Konzentration</u>	≥165 VIEU/ml	n	0	11	0.056
		%	0%	100%	
<u>IgG-anti-FSME - Avidität</u>	>60%	n	0	11	0.596
		%	0%	100%	

Tabelle 18: Kreuztabelle des FSME-Neutralisationstiter und der IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität bei FSME-geimpften Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen. Der Neutralisationstiter ist bei >10 positiv. Die IgG-anti-FSME-Konzentration ist bei ≥165 VIEU/ml positiv. Die IgG-anti-FSME-Avidität wird bei >60% als hoch und bei 40-60% als intermediär avide gewertet. Alle Probanden haben eine vollständige Grundimmunisierung gegen FSME. P-Werte nach dem Mann-Whitney-U-Test.

In den Abbildungen 28 und 29 sind die Korrelationen zwischen dem Neutralisationstiter und der IgG-anti-FSME-Konzentration abgebildet. Die Mehrzahl der IgG-anti-FSME-Konzentration war hochpositiv bei Werten über 1000 VIEU/ml und wurde aufgrund der Verzerrung der Werte nicht miteinbezogen. Abbildungen 30 und 31 zeigt die Korrelation zwischen dem Neutralisationstiter und der IgG-anti-FSME-Avidität bei den Patienten mit JIA und den gesunden Kontrollprobanden.

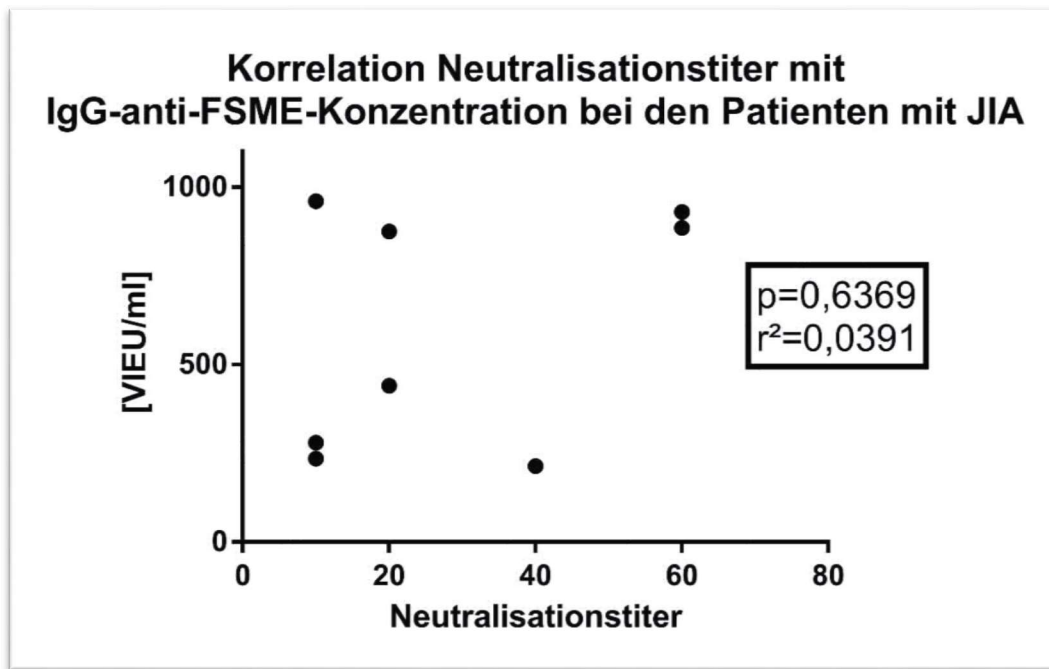


Abbildung 28: Korrelation des FSME Neutralisationstiter mit der IgG-anti-FSME-Konzentration bei den Patienten mit JIA. Werte über 1000 VIEU/ml wurden aufgrund Verfälschung der Werte nicht miteinbezogen. Nach der Rangkorrelation nach Spearman besteht keine signifikante Korrelation.

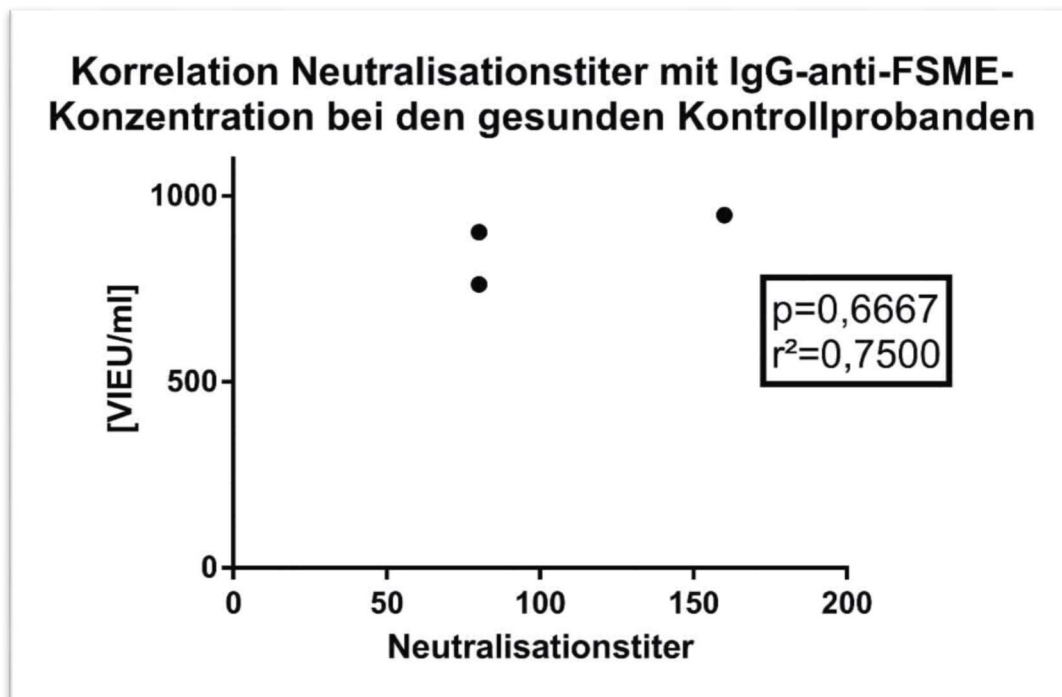


Abbildung 29: Korrelation des FSME Neutralisationstiter mit der IgG-anti-FSME-Konzentration bei den gesunden Kontrollprobanden. Werte über 1000 VIEU/ml wurden aufgrund Verfälschung der Werte nicht miteinbezogen. Nach der Rangkorrelation nach Spearman besteht keine signifikante Korrelation.

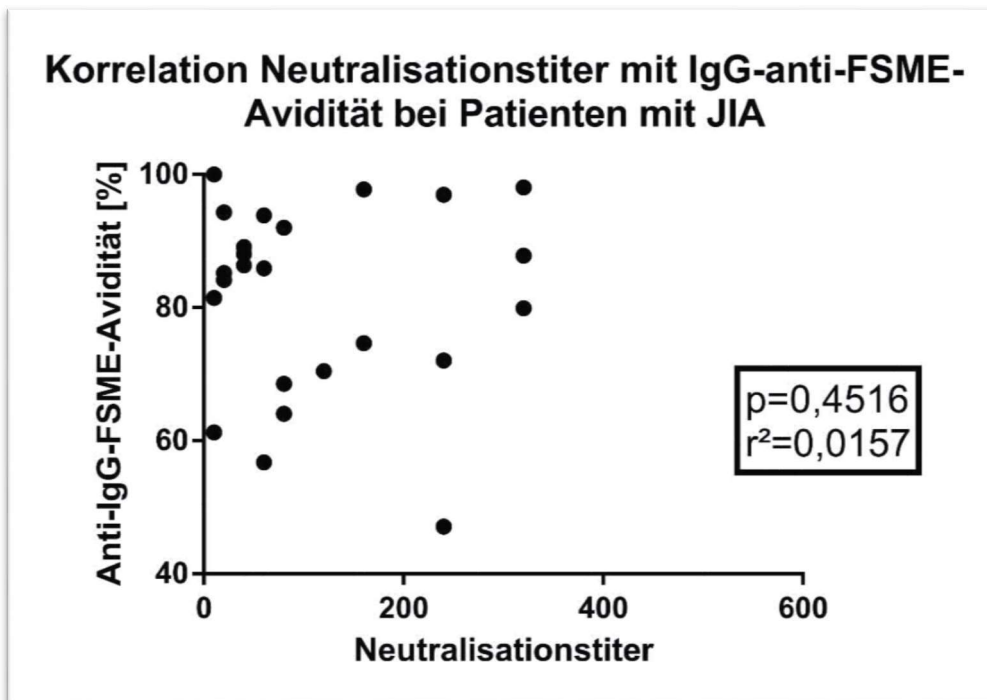


Abbildung 30: Korrelation des FSME Neutralisationstiter mit der IgG-anti-FSME-Avidität bei den Patienten mit JIA. Nach der Rangkorrelation nach Spearman besteht keine signifikante Korrelation.

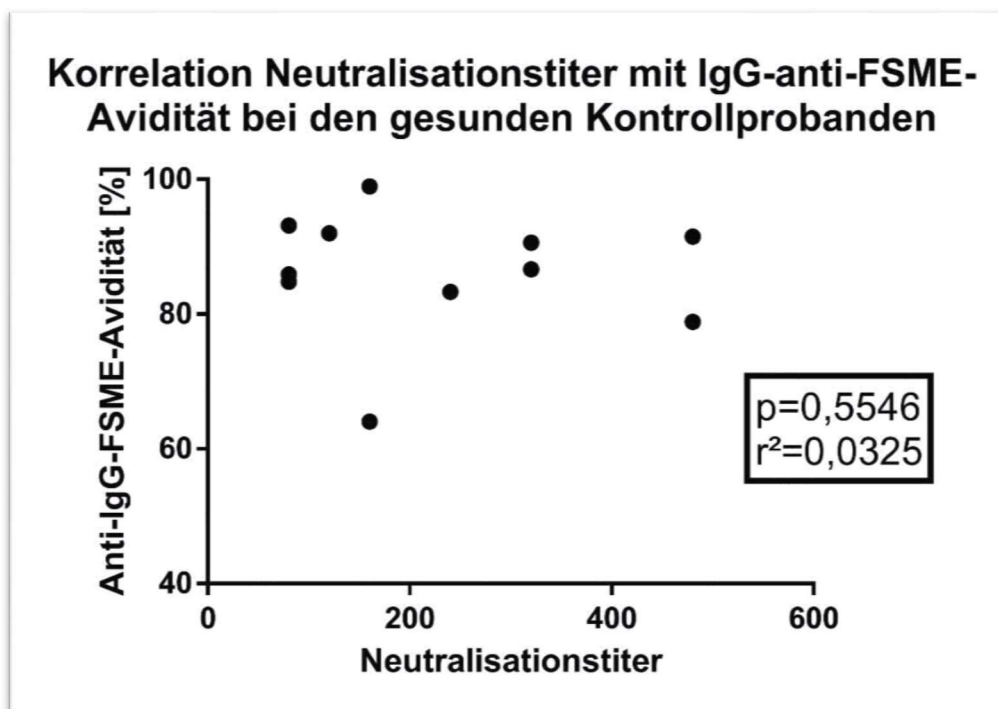


Abbildung 31: Korrelation des FSME Neutralisationstiter mit der IgG-anti-FSME-Avidität bei den gesunden Kontrollprobanden. Nach der Rangkorrelation nach Spearman besteht keine signifikante Korrelation.

4.5 Zelluläre Immunität

4.5.1 Interferon γ – ELISPOT

Die Interferon (INF) γ – ELISPOTs wurden insgesamt von 80 Patienten mit JIA und von 31 gesunden Kontrollen durchgeführt. Von der statistischen Auswertung ausgeschlossen wurden diejenigen, deren Negativkontrolle über 900 SFU/10⁶ Zellen zeigte und diejenigen mit einer Positivkontrolle, welche nicht positiv war, also wenn die Stimulation mit PHA ein Ergebnis von unter 0 SFU/10⁶ Zellen hatte. Von den 80 Patienten hatten sieben Patienten unspezifisch eine zu hohe Negativkontrolle und acht eine negative Positivkontrolle. Bei den 31 gesunden Kontrollprobanden wurden fünf ausgeschlossen, da diese bei einer Stimulation mit PHA ein Ergebniss von unter 0 SFU/10⁶ Zellen hatten. Im Folgenden bezieht sich deshalb die Auswertung nur auf 65 JIA Patienten und 26 Kontrollen.

Der Mittelwert der Positivkontrollen, bei welchen die Zellen mit PHA stimuliert wurden, war bei den Patienten mit JIA bei 764 SFU/10⁶ Zellen und bei den Kontrollen bei 704 SFU/10⁶ Zellen.

Abbildung 32 stellt eine Übersicht über die Ergebnisse nach Stimulation mit dem Anti-FSME-Antigen dar. Hier lagen die Mittelwerte bei den JIA Patienten bei 235 SFU/10⁶ PBMCs und bei den gesunden Kontrollen bei 144 SFU/10⁶ PBMCs. Dieser Unterschied ist mit einem p-Wert von <0,0001 statistisch signifikant.

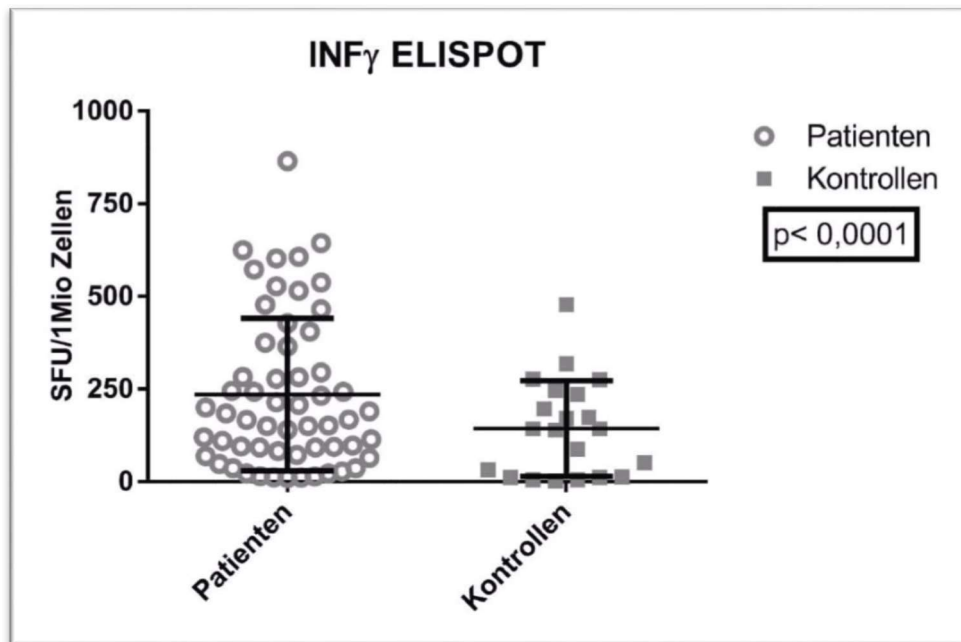


Abbildung 32: Übersicht über die Ergebnisse des INF γ -ELISPOTs nach Stimulation mit dem Anti-FSME-Antigen. Angabe in Spot forming units (SFU)/ 10^6 Zellen. Gegenüberstellung von FSME-geimpften Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung. Der p-Wert (Mann-Whitney-U-Test) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied.

4.5.1.1 Aufteilung in Responder

Von den 65 Patienten mit JIA hatten 8 zwar eine positive Positivkontrolle, aber es zeigten sich jedoch keine SFU/ 10^6 PBMCs nach Stimulation mit dem Anti-FSME-Antigen. Diese wurden als Non Responder definiert. Die restlichen wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: die High Responder mit ≥ 50 SFU/ 10^6 PBMCs und die Low Responder mit < 50 SFU/ 10^6 PBMCs nach Stimulation mit dem Anti-FSME-Antigen (53).

Bei den JIA-Patienten waren 57.5% High Responder und 13.8% Low Responder, siehe Tabelle 19. 10% der Patienten wurde als Non-Responder definiert. Bei den gesunden Kontrollen war die Aufteilung folgendermaßen: 45.2% High Responder, 22.6% Low Responder und 16.1% Non Responder.

	Patienten mit JIA	Gesunde Kontrollen	p-Wert
High Responder [n; %]	46; 57.5	14; 45.2	0.505
Low Responder [n; %]	11; 13.8	7; 22.6	0.460
Non Responder [n; %]	8; 10.0	5; 16.1	0.368

Tabelle 19: Aufteilung der Patienten mit JIA und der Kontrollen in die verschiedenen Responder des INF γ -ELISPTs (High Responder: SFU FSME-AG-stimuliert > 50 SFU/10⁶ PBMCs, Low Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 50 SFU/10⁶ PBMCs, No Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 0 SFU/10⁶ PBMCs aber SFU PHA-stimuliert > 0 SFU/10⁶ PBMCs). Die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test) zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied.

In Abbildung 33 sind repräsentative Ergebnisse der INF γ -ELISPOTs von Kinder und Jugendlichen mit JIA und gesunden Kontrollen zu sehen. Die einzelnen Spot forming Units sind deutlich erkennbar. Zu sehen sind die nicht stimulierte Negativkontrolle, die mit Anti-FSME-Antigen stimulierten Zellen und die mit PHA stimulierte Positivkontrolle. Es handelt sich um eine Gegenüberstellung der verschiedenen Responder-Gruppen.

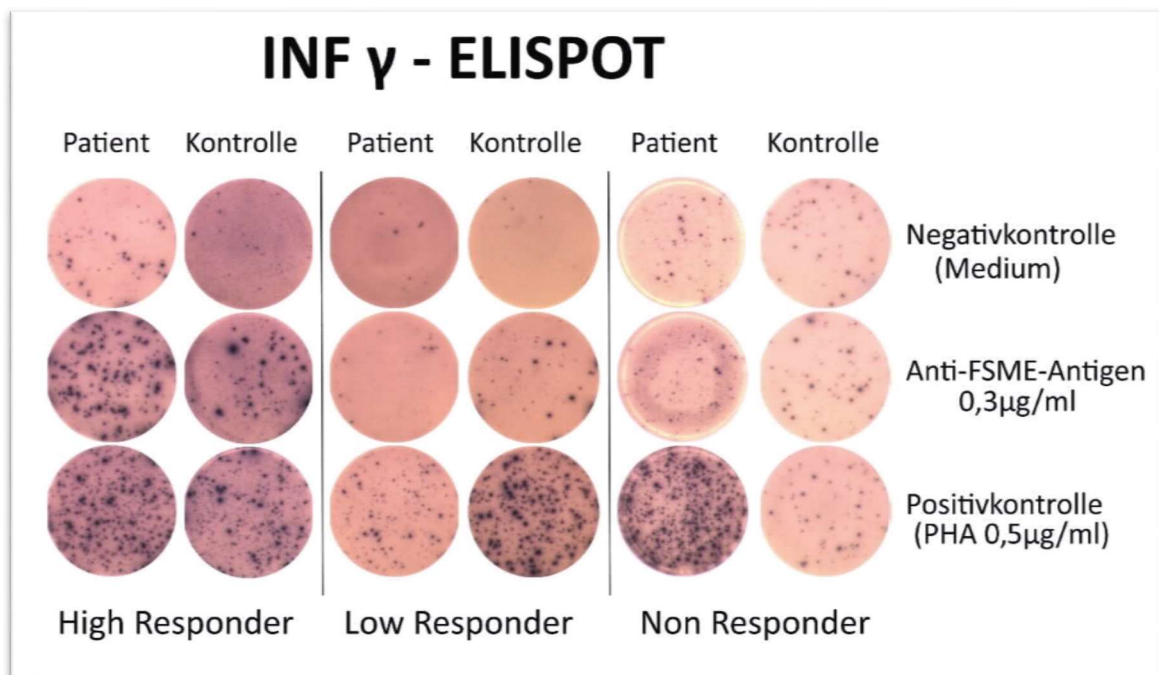


Abbildung 33: Ergebnisse des INF γ -ELISPOTs. Repräsentative Abbildung je eines Patienten mit JIA und einer gesunden Kontrolle. Legende: High Responder: SFU FSME-AG-stimuliert > 50 SFU/10⁶ PBMCs, Low Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 50 SFU/10⁶ PBMCs, No Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 0 SFU/10⁶ PBMCs aber SFU PHA-stimuliert > 0 SFU/10⁶ PBMCs. (Abkürzungen: SFU=Spot forming Unit, FSME=Frühsommer-Meningoencephalitis, AG=Antigen, PBMC=Periphere mononukleäre Blutzellen, PHA= Phytohämagglutinin)

Abbildungen 34 und 35 zeigen die Verteilung der SFU/10⁶ PBMCs der High und Low Responder nach Stimulierung mit dem Anti-FSME-Antigen. Verglichen werden jeweils die JIA-Patienten und die gesunden Kontrollprobanden. Der p-Wert zum Vergleich

zwischen JIA und Kontrollprobanden für die High Responder Gruppe liegt bei $<0,0001$ und für die Low Responder bei $0,0147$.

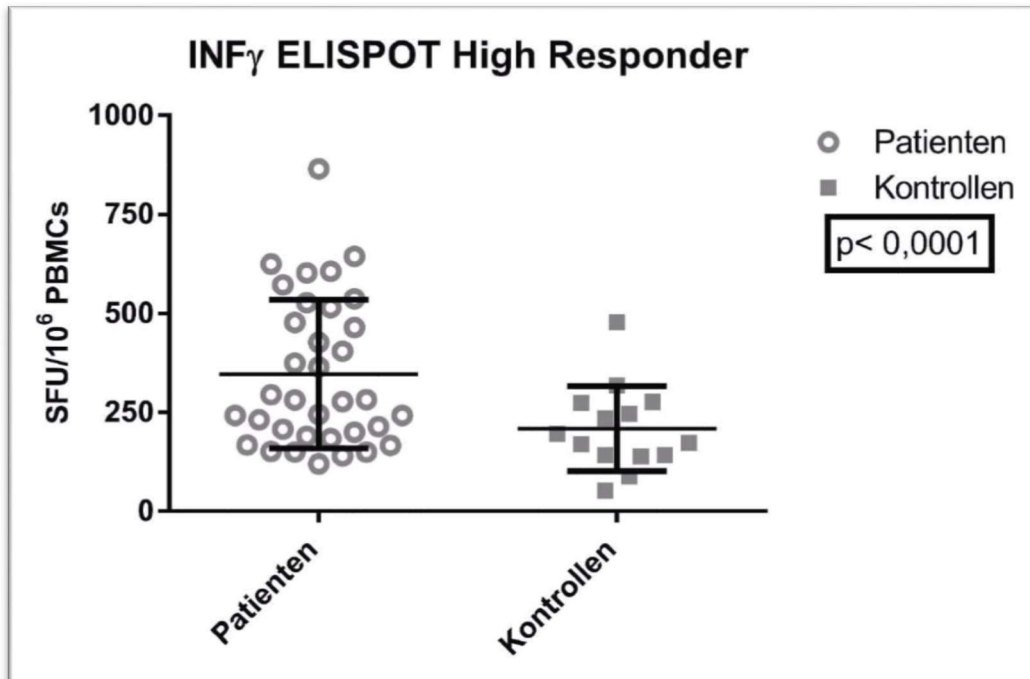


Abbildung 34: Verteilung der SFU/10⁶ PBMCs der High Responder nach Stimulierung mit dem Anti-FSME-Antigen. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung. Der p-Wert (Mann-Whitney-U-Test) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied. (High Responder: SFU FSME-AG-stimuliert > 50 SFU/10⁶ PBMCs)

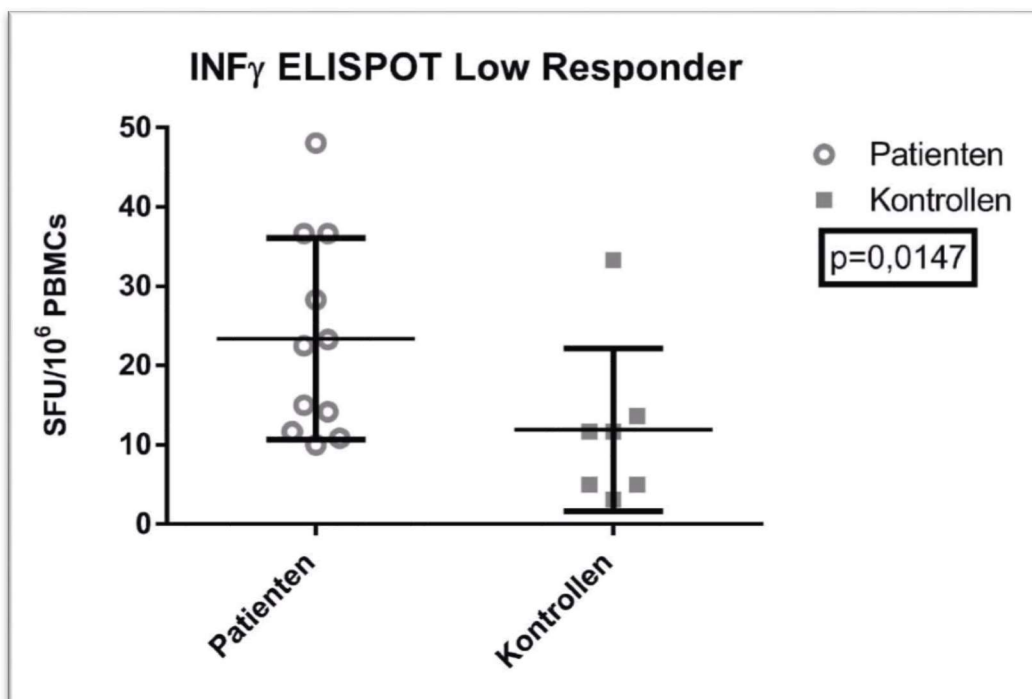


Abbildung 35: Verteilung der SFU/10⁶ PBMCs der Low Responder nach Stimulierung mit dem Anti-FSME-Antigen. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung. Der p-Wert (Mann-Whitney-U-Test) zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied. (Low Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 50 SFU/10⁶ PBMCs)

Tabelle 20 zeigt eine Übersicht über die Verteilung der Subgruppen und Medikation der verschiedenen Responder Gruppen.

	High Responder	Low Responder	No Responder
<i>Klassifikation</i>			
systemische JIA [n; %]	2; 4.3	1; 9.1	1; 12.5
Polyarthritits, RF + [n; %]	1; 2.2	-	-
Polyarthritits, RF - [n; %]	5; 10.9	4; 36.4	3; 37.5
Oligoarthritits [n; %]	16; 34.8	2; 18.2	-
Arthritits mit Enthesitits [n; %]	5; 10.9	-	-
Psoriasis-Arthritits [n; %]	5; 10.9	1; 9.1	1; 12.5
Nicht klassifiziert [n; %]	8; 17.4	1; 9.1	2; 25.0
Nicht dokumentiert [n; %]	4; 8.7	2; 18.2	1; 12.5
<i>Medikation während Blutentnahme</i>			
NSAR [n; %]	13; 31.7	2; 22.2	3; 42.9
MTX [n; %]	18; 43.9	4; 44.4	-
Hydroxychloroquin [n; %]	2; 4.9	-	-
Leflunomid [n; %]	-	-	1; 14.3
Sulfasalazin [n; %]	2; 4.9	-	-
Glukokortikoide [n; %]	2; 4.9	1; 11.1	1; 14.3
Etanercept [n; %]	4; 9.8	3; 33.3	1; 14.3
Adalimumab [n; %]	1; 2.4	-	-
Infliximab [n; %]	-	-	1; 14.3
Tolicilizumab [n; %]	1; 2.4	-	-
Anakinra [n; %]	-	1; 11.1	-
<i>Medikation während 1. Impfung</i>			
NSAR [n; %]	4; 9.8		2; 40.0
MTX [n; %]	5; 12.9	2; 22.2	-
Hydroxychloroquin [n; %]	1; 2.4	-	-
Leflunomid [n; %]	-	-	-
Azathioprin [n; %]	-	-	-
Sulfasalazin [n; %]	-	-	1; 16.7
Glukokortikoide [n; %]	-	-	-
Etanercept [n; %]	1; 2.4	-	-
Adalimumab [n; %]	1; 2.4	-	-
Infliximab [n; %]	-	-	-
Tolicilizumab [n; %]	-	-	-
Anakinra [n; %]	-	1; 11.1	-
Anzahl der FSME-Impfungen ^a	4.1±0.9 (4.0; 3.0-6.0)	3.8±1.0 (4.0; 3.0-6.0)	3.6±0.5 (4.0; 3.0-4.0)

Tabelle 20: Verteilung der Klassifikation, Medikation und der FSME-Impfungen bei den High, Low und Non Respondern des INF γ – ELISPOTs nach Stimulation mit Anti-FSME-Antigen. Es handelt sich um FSME-geimpfte Patienten mit JIA. Legende: ^a Mittelwert \pm Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum). High Responder: SFU FSME-AG-stimuliert > 50 SFU/10⁶ PBMCs, Low Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 50 SFU/10⁶ PBMCs, No Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 0 SFU/10⁶ PBMCs aber SFU PHA-stimuliert > 0 SFU/10⁶ PBMCs. (Abkürzungen: JIA=juvenile idiopathische Arthritis, RF +/- = Rheumafaktor positiv/negativ, NSAID=nicht-steroidale Antirheumatika, MTX=Methotrexat, FSME=Frühsommer-Meningoenzephalitis)

Die durchschnittliche Anzahl der FSME-Impfungen variiert nur leicht zwischen den verschiedenen Gruppen. Der Mittelwert für die High Responder liegt bei 4,1 Impfungen. Die Low Responder hatten 3,8 und die Non Responder 3,6 FSME Impfungen im Schnitt. Alle besaßen eine vollständige Grundimmunisierung, die Non Responder hatten jedoch höchstens noch eine Booster-Impfung, während die anderen zwei Gruppen bis zu sechs Impfungen gegen FSME bekommen hatten.

4.5.1.2 Vergleich der zellulären Immunität mit der Anzahl der FSME-Impfungen

Außer den Patienten und Kontrollen mit vollständiger Grundimmunisierung gab es auch ein paar, deren Impfstatus nicht vollständig oder unbekannt war. Wie in Tabelle 21 zu sehen ist, teilen sich diejenigen JIA Patienten mit nur einer oder zwei Impfungen gegen FSME gleichmäßig in die verschiedenen Responder Gruppen auf. Drei Patienten ohne FSME Impfung hatten $< 50 \text{ SFU}/10^6$ Zellen und fielen damit in die Gruppe der Low Responder. Bei drei weiteren Patienten war der Impfstatus nicht bekannt, diese zeigten eine hohe Reaktivität bei Stimulation mit dem Anti-FSME-Antigen und gehörten damit zu den High Respondern. Von denjenigen, die eine vollständige Grundimmunisierung waren 71% High Responder, 17% Low Responder und 12% Non Responder.

Bei den gesunden Kontrollen gab es zwei Probanden ohne FSME Impfung, je einer war ein High beziehungsweise Low Responder. Der Kontrollproband mit unbekanntem Impfdaten gehörte zu den High Respondern. Die gesunden Kontrollprobanden mit drei oder mehr Impfungen zählten 54% zu den High Respondern, 27% zu den Low Respondern und 17% zu den Non Respondern.

FSME- Impfungen	High Responder	Low Responder	Non Responder
<u>Patienten mit JIA</u>			
Unbekannt	3	0	0
> 3 Impfungen	46	11	8
1-2 Impfungen	2	2	2
Keine Impfung	0	3	0
<u>Gesunde Patienten</u>			
Unbekannt	1	0	0
> 3 Impfungen	14	7	5
Keine Impfung	1	1	0

Tabelle 21: Kreuztabelle der zellulären Immunität gemessen anhand eines INF γ -ELISPOTS und Anzahl der FSME-Impfungen bei Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen. Die Grundimmunisierung ist bei 3 Impfungen abgeschlossen. High Responder: SFU FSME-AG-stimuliert > 50 SFU/10⁶ PBMCs, Low Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 50 SFU/10⁶ PBMCs, No Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 0 SFU/10⁶ PBMCs aber SFU PHA-stimuliert > 0 SFU/10⁶ PBMCs.

Die Krankheit JIA hatte einen positiven Einfluss auf die zelluläre Immunität unabhängig von der Anzahl der FSME-Impfungen. Dies ist in Abbildung 36 gezeigt. Die Mittelwerte des INF γ -ELISPOT waren bei den Patienten mit JIA bei Vorhandensein der Grundimmunisierung ($p=0,628$), bei einer Boosterimpfung ($p=0,162$) und bei zwei Boosterimpfungen ($p=0,275$) höher als bei den gesunden Kontrollen.

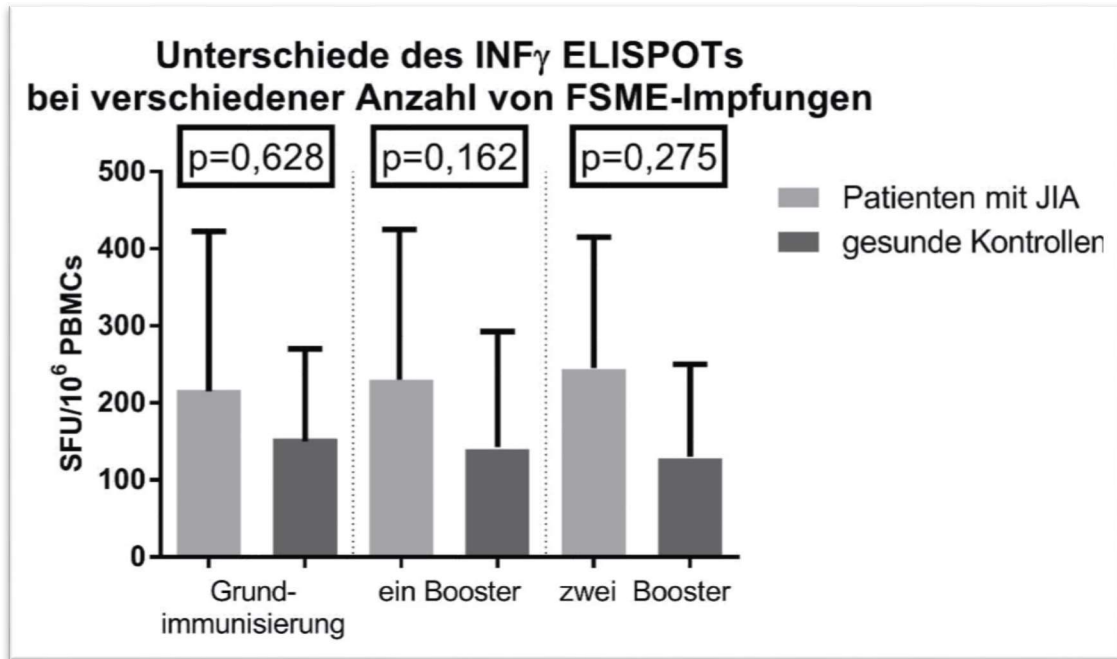


Abbildung 36: Vergleich der zellulären Immunität von Patienten mit JIA und gesunden Kindern bei verschiedener Anzahl von FSME-Impfungen. Die Grundimmunisierung ist mit 3 Teilimpfungen gegen FSME abgeschlossen. Es ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung der $\text{INF}\gamma$ -ELISPOTs abgebildet und in $\text{SFU}/10^6$ PBMCs angegeben. Die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied. (Abkürzungen: JIA = Juvenile idiopathische Arthritis, SFU = Spot forming Units, PBMCs = periphere mononukleäre Blutzellen).

Hatten die Patienten bereits bei der primären Impfung juvenile idiopathische Arthritis, wirkte sich dies negativ auf die zelluläre Immunität aus, siehe Abbildung 37. Der Mittelwert des $\text{INF}\gamma$ -ELISPOTs war statistisch signifikant niedriger, als wenn die Patienten zu dem Zeitpunkt noch nicht an JIA erkrankt waren ($p=0,040$).

Zum Zeitpunkt der Boosterimpfung zeigte sich nur ein geringer und statistisch nicht signifikanter Unterschied zwischen den zu dem Zeitpunkt noch nicht diagnostizierten Patienten und den Patientin mit JIA.

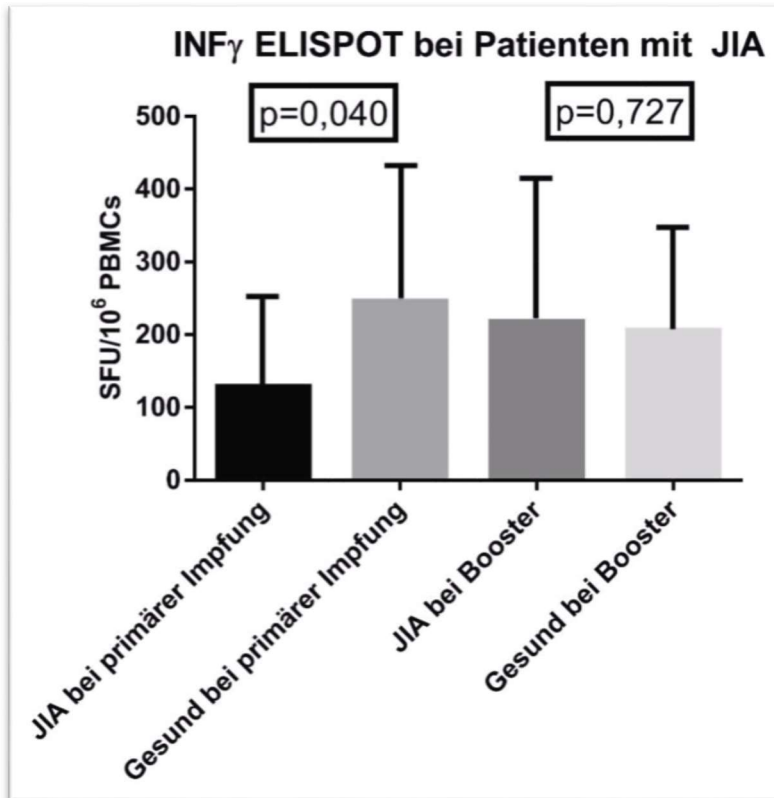


Abbildung 37: Die zelluläre Immunität der JIA Patienten bei verschiedenem Krankheitsstatus. Verglichen wurden die Mittelwerte der INF γ -ELISPOTs angegeben in SFU/10⁶ PBMCs bei der primären Impfung bzw. bei Boosterimpfung zwischen Patienten mit bereits gestellter JIA Diagnose und zu dem Zeitpunkt noch gesunden Kindern und Jugendlichen. Angabe der Mittelwerte sowie der Standardabweichung. Der p-Wert 0,04 (Mann-Whitney-U-Test) zeigt zum Zeitpunkt der primären Impfung einen statistisch signifikanten Unterschied. (Abkürzung: JIA = Juvenile idiopathische Arthritis, SFU = Spot forming Units, PBMCs = periphere mononukleäre Blutzellen)

4.5.1.3 Einfluss der Medikation auf die zelluläre Immunität

Eine Medikation mit Methotrexat hatte einen positiven Einfluss auf die zelluläre Immunität. In Abbildung 38 ist der nicht signifikante Einfluss des Medikaments auf die INF γ -ELISPOTs gezeigt.

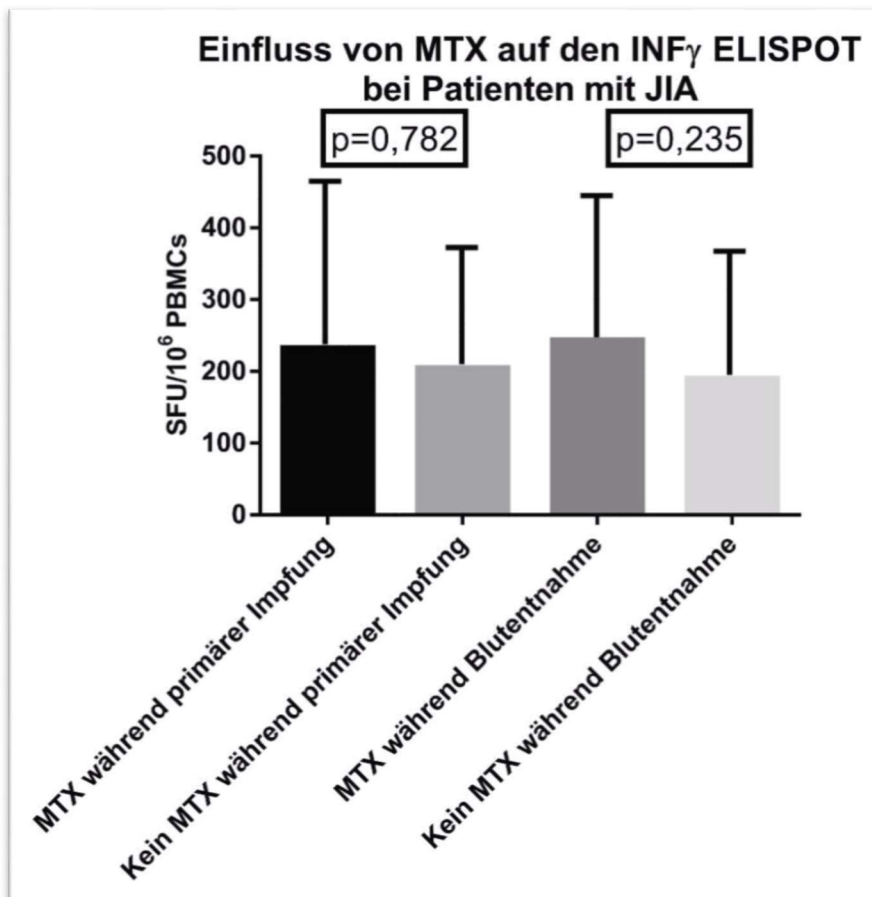


Abbildung 38: Einfluss von MTX auf die zelluläre Immunität bei Patienten mit JIA. Vergleich der Mittelwerte der INF γ -ELISPOTS angegeben in SFU/10⁶ PBMCs bei einer Therapie mit bzw. ohne MTX während der primären FSME-Impfung und dem Zeitpunkt der Blutentnahme. Angabe der Mittelwerte sowie der Standardabweichung. Die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied. (Abkürzungen: MTX = Methotrexat, JIA = Juvenile idiopathische Arthritis, SFU = Spot forming Units, PBMCs = periphere mononukleäre Blutzellen)

Eine Medikation mit TNF α -Inhibitoren hatte einen Trend zu einem positiven Einfluss auf die zelluläre Immunität. Dies ist in Abbildung 39 zu sehen.

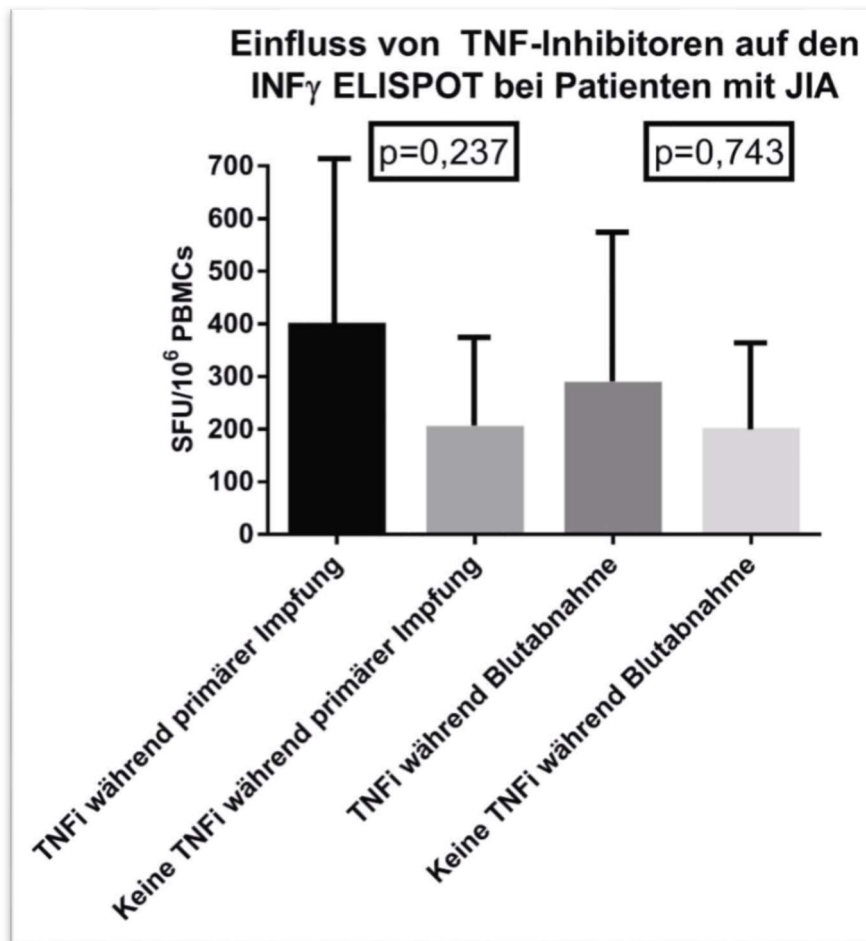


Abbildung 39: Einfluss von TNF α -Inhibitoren auf die zelluläre Immunität bei Patienten mit JIA. Vergleich der Mittelwerte der INF γ -ELISPOTs angegeben in SFU/10⁶ PBMCs bei einer Therapie mit bzw. ohne TNF α -Inhibitoren während der primären FSME-Impfung und dem Zeitpunkt der Blutentnahme. Angabe der Mittelwerte sowie der Standardabweichung. Die p-Werte (Mann-Whitney-U-Test) zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied. (Abkürzungen: TNFi = TNF α -Inhibitor, JIA = Juvenile idiopathische Arthritis, SFU = Spot forming Units, PBMCs = periphere mononukleäre Blutzellen)

4.6 Korrelation zwischen der zellulären und humoralen Immunität

Im Folgenden werden die Parameter IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität sowie die Neutralisationstiter für die humorale Immunität mit den Ergebnissen des INF γ – ELISPOTs als Parameter für die zelluläre Immunität verglichen.

4.6.1 INF γ -ELISPOT und IgG-anti-FSME-Konzentration

Tabelle 22 zeigt den Vergleich der IgG-anti-FSME-Konzentration mit den Ergebnissen des INF γ – ELISPOTs. Von den Patienten mit JIA, die als High Responder definiert wurden, hatten 71.7% eine hochpositive IgG-anti-FSME-Konzentration und die restlichen 28.3% waren normal positiv. Bei den Low Respondern war ebenfalls die

Mehrzahl mit 63.6% hochpositiv, weitere 18.2% waren positiv und je ein Patient (9.1%) grenzwertig und negativ. Von den Non Respondern waren drei Patienten mit JIA hochpositiv und fünf JIA Patienten hatten eine hohe IgG-anti-FSME-Konzentration. Von den gesunden Kontrollprobanden waren alle IgG-anti-FSME-Konzentrationen über 165 VIEU/ml und damit positiv. Jeweils über die Hälfte davon waren hochpositiv, wobei die High Responder mit 85.7% der größte Anteil waren.

	IgG-anti-FSME-Konzentration			
	>1000 VIEU/ml	165-1000 VIEU/ml	120-165 VIEU/ml	<120 VIEU/ml
Patienten mit JIA				
High Responder [n;%]	33; 71.7	13; 28.3	0; 0.0	0; 0.0
Low Responder [n;%]	7; 63.6	2; 18.2	1; 9.1	1; 9.1
Non Responder [n;%]	3; 37.5	5; 62.5	0; 0.0	0; 0.0
Gesunde Kontrollen				
High Responder [n;%]	12; 85.7	2; 14.3	0; 0.0	0; 0.0
Low Responder [n;%]	4; 57.1	3; 42.9	0; 0.0	0; 0.0
Non Responder [n;%]	3; 60.0	2; 40.0	0; 0.0	0; 0.0

Tabelle 22: Vergleich der IgG-anti-FSME-Konzentration mit den verschiedenen Responder Gruppen des INF γ -ELISPOTs. Legende: High Responder: SFU FSME-AG-stimuliert > 50 SFU/10⁶ PBMCs, Low Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 50 SFU/10⁶ PBMCs, No Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 0 SFU/10⁶ PBMCs aber SFU PHA-stimuliert > 0 SFU/10⁶ PBMCs; Anti-IgG-FSME-Konzentration: hochpositiv= >1000 VIEU/ml, positiv= 165-1000 VIEU/ml, grenzwertig= 120-165 VIEU/ml, negativ= <120 VIEU/ml.

Für eine Korrelation der SFU/10⁶ PBMCs mit der IgG-anti-FSME-Konzentration wurden diejenigen mit hochpositiver IgG-anti-FSME-Konzentration (>1000 VIEU/ml) aufgrund des Verfälschungsrisikos nicht miteinbezogen. Abbildung 40 zeigt ein Diagramm für diese Gegenüberstellung. Es besteht keine statistisch relevante Korrelation.

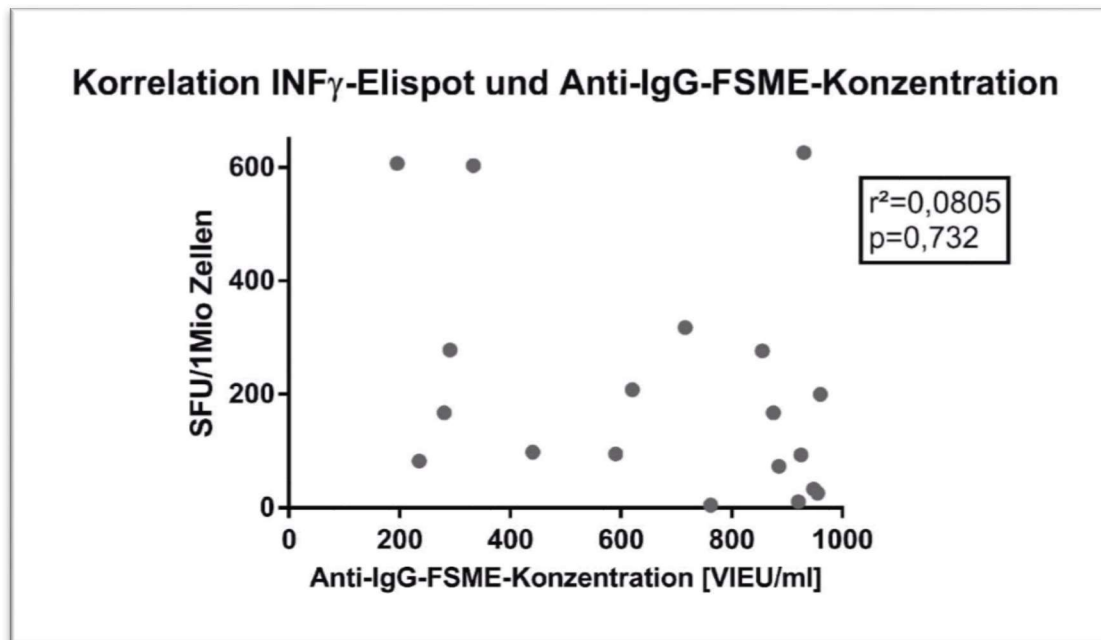


Abbildung 40: Korrelation INF γ -ELISPOT und IgG-anti-FSME-Konzentration. Die Anti-IgG-FSME-Konzentrationen >1000 VIEU/ml wurde hierbei aufgrund des Verfälschungsrisikos nicht mit einbezogen. Keine statistisch relevante Korrelation (Rangkorrelation nach Spearman).

4.6.2 INF γ -ELISPOT und IgG-anti-FSME-Avidität

In Tabelle 23 ist der Vergleich zwischen der IgG-anti-FSME-Avidität und des INF γ – ELISPOTs als Kreuztabelle zu sehen. Bei den Patienten mit JIA waren von den High Respondern des INF γ –ELISPOTs 93.5% auch hoch avide, die restlichen drei JIA Patienten hatten eine intermediäre IgG-anti-FSME-Avidität. Bei den Low Respondern waren 90.9% hoch avide und ein einzelner Patient war intermediär avide. Von den Non Respondern zeigten alle acht Patienten eine hohe IgG-anti-FSME-Avidität.

Bei den gesunden Kindern und Jugendlichen der Kontrollpopulation waren alle 28 hoch avide.

	IgG-anti-FSME-Avidität		
	≥ 60 %	40 – 60 %	< 40 %
Patienten mit JIA			
High Responder [n;%]	43; 93.5	3; 6.5	0; 0
Low Responder [n;%]	10; 90.9	1; 9.1	0; 0
Non Responder [n;%]	8; 100	0; 0	0; 0
Gesunde Kontrollen			
High Responder [n;%]	14; 100.0	0; 0.0	0; 0.0
Low Responder [n;%]	7; 100.0	0; 0.0	0; 0.0
Non Responder [n;%]	5; 100.0	0; 0.0	0; 0.0

Tabelle 23: Vergleich der IgG-anti-FSME-Avidität mit den verschiedenen Responder Gruppen des INF γ -ELISPOTS.

Legende: High Responder: SFU FSME-AG-stimuliert > 50 SFU/10⁶ PBMCs, Low Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 50 SFU/10⁶ PBMCs, No Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 0 SFU/10⁶ PBMCs aber SFU PHA-stimuliert > 0 SFU/10⁶ PBMCs; Anti-IgG-FSME-Avidität: hoch avide= ≥60%, intermediär avide= 40-60%, negativ= <40%

Für die Korrelation zwischen dem INF γ -ELISPOTS und der IgG-anti-FSME-Avidität wurden die SFU/10⁶ Zellen und der dazugehörige RAI der IgG-anti-FSME-Avidität in Abbildung 41 aufgezeichnet. Der p-Wert ist 0,418 und $r^2=0,0001$ nach Spearman. Somit besteht keine signifikante Korrelation der zwei Parameter.

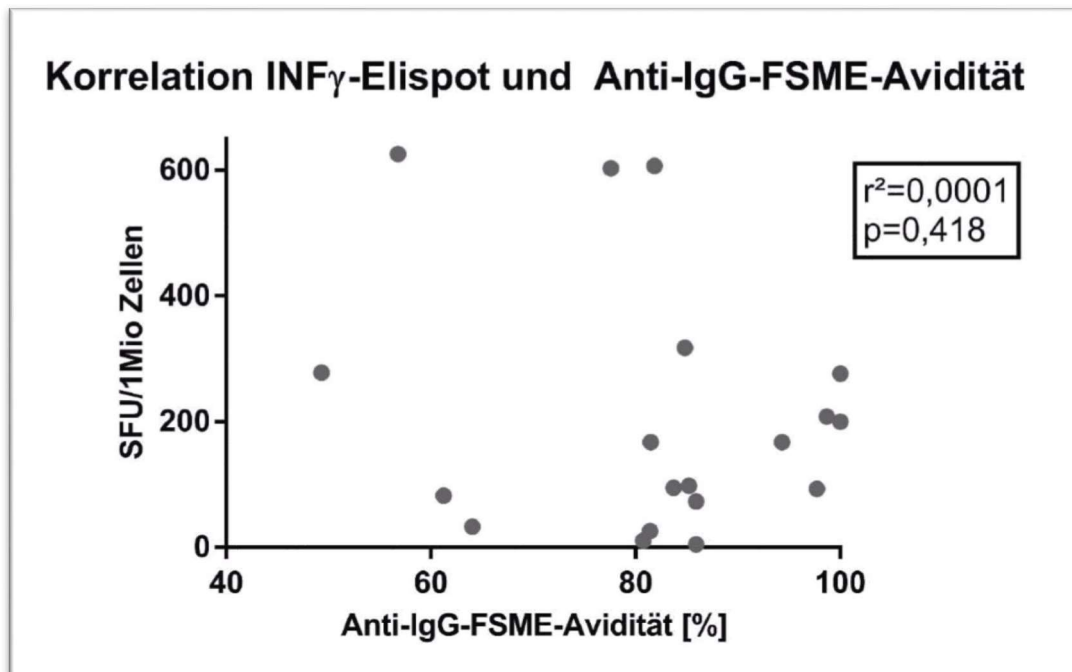


Abbildung 41: Korrelation INF γ -ELISPOT und IgG-anti-FSME-Avidität. Darstellung des INF γ -ELISPOTS in SFU/10⁶ PBMCs. Keine statistisch signifikante Korrelation bei $p=0,418$ und $r^2=0,0001$ (Rangkorrelation nach Spearman).

4.6.3 INF γ -ELISPOT und Neutralisationstiter

In Tabelle 24 ist der Vergleich der Neutralisationstiter mit dem INF γ -ELISPOT gezeigt. 80% derjenigen Patienten mit JIA, die bei INF γ -ELISPOT High Responder waren, hatten

ebenfalls einen positiven Neutralisationstiter >10. Bei den Low Responder der Patienten waren es 100% und bei den Low Respondern hatte die Hälfte einen positiven und die anderen einen negativen Neutralisationstiter.

Bei den gesunden Kontrollen hatten alle einen positiven Neutralisationstiter, egal welcher Responder Gruppe des INF γ -ELISPOTs sie angehörten.

	Neutralisationstiter	
	NT < 10	NT > 10
Patienten mit JIA		
High Responder [n; %]	4; 20.0	16; 80.0
Low Responder [n; %]	0; 0.0	2; 100.0
Non Responder [n; %]	1; 50.0	1; 50.0
gesunden Kontrollen		
High Responder [n; %]	0; 0.0	6; 100.0
Low Responder [n; %]	0; 0.0	3; 100.0
Non Responder [n; %]	0; 0.0	2; 100.0

Tabelle 24: Vergleich des Neutralisationstiter mit den verschiedenen Responder Gruppen des INF γ -ELISPOTs.
 Legende: High Responder: SFU FSME-AG-stimuliert > 50 SFU/10⁶ PBMCs, Low Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 50 SFU/10⁶ PBMCs, No Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 0 SFU/10⁶ PBMCs aber SFU PHA-stimuliert > 0 SFU/10⁶ PBMCs; Neutralisationstiter: positiv= >10, negativ= <10

Abbildung 42 zeigt die Korrelation des INF γ -ELISPOTs mit den Werten der Neutralisationstests. Der p-Wert beträgt 0,527 und r² nach Spearman ist 0,0001.

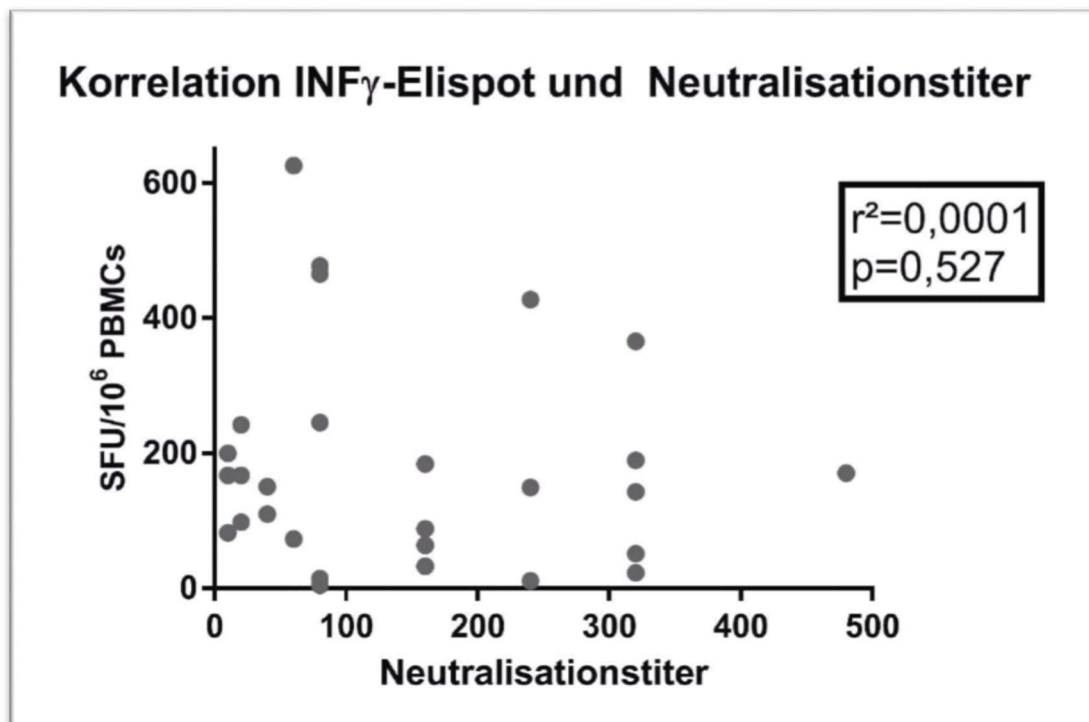


Abbildung 42: Korrelation INF γ -ELISPOT und Neutralisationstiter. Darstellung des INF γ -ELISPOTs in SFU/10⁶ PBMCs. Es zeigt sich keine statistisch signifikante Korrelation (Rangkorrelation nach Spearman).

4.7 Zusammenfassung der FSME-spezifischen humoralen und zellulären Immunität

Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Tabelle 25 dargestellt.

	JIA Patienten	Gesunde Kontrollen	p-Wert
IgG-anti-FSME-Konzentration			
Anzahl der durchgeführten IgG-anti-FSME-Konzentrationen	99	31	-
IgG-anti-FSME-Konzentration (VIEU/ml) <120/120-165/≥165-1000/>1000 (n/n/n/n)	1/1/22/75	0/0/8/23	0.220
IgG-anti-FSME-Konzentration ≥165 VIEU/ml (n; %)	97; 98	31; 100	0.858
IgG-anti-FSME-Avidität			
Anzahl der durchgeführten IgG-anti-FSME-Aviditäten	99	31	-
IgG-anti-FSME-Avidität (RAI %) ^a	81.3±12.3 (83.3; 47.1-100)	86.4±11.7 (86.7; 60.3-100)	0.027
IgG-anti-FSME-Avidität <40/40-60/>60% (n/n/n)	0/5/94	0/0/31	0.333
IgG-anti-FSME-Avidität RAI >60% (n; %)	94; 94.9	31; 100	0.250
Neutralisationstests			
Anzahl der durchgeführten Neutralisationstests	26	11	-
Neutralisationstiter >1:10 (n; %)	23; 88.5	11; 100	0.160
Median der Neutralisationstests (min-max)	80 (10-3840)	160 (80-480)	0.111
IFNγ ELISPOTs			
Anzahl der IFN γ ELISPOTs	80	31	-
ELISPOTs mit positiver PHA Kontrolle	65	26	-
SFU PHA-stimuliert (Positivkontrollen) ^{a b}	763.6±618.3 (650.8; 6.7-3837.4)	703.9±473.7 (575.8; 105.0-1832.5)	0.810
SFU FSME-Antigen-stimuliert (nur Responder) ^{a b}	235.2±206.0 (167.5; 10.0-865.8)	143.8±129.2 (142.5; 3.1-477.5)	0.075
High Responder/Low Responder/Non-Responder (n/n/n) ^c	46/11/8	14/7/5	0.506
Responder (n; %)	57; 87.7	21; 80.7	0.195

Tabelle 25: FSME-spezifische humorale und zelluläre Immunität bei FSME-geimpften Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen. Legende: ^a Mittelwert ± Standardabweichung (Median; Minimum-Maximum); ^b berechnete Werte (=SFU/10⁶ PBMCs Stimuliert minus SFU/10⁶ PBMCs Negativkontrolle); ^c High Responder: SFU FSME-AG-stimuliert > 50 SFU/10⁶ PBMCs, Low Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 50 SFU/10⁶ PBMCs, No Responder: SFU FSME-AG-stimuliert < 0 SFU/10⁶ PBMCs aber SFU PHA-stimuliert > 0 SFU/10⁶ PBMCs (Abkürzungen: IgG: Immunglobulin G, VIEU: Vienna International Units, RAI: relativer Aviditätsindex, SFU: spot forming units, PBMC: Periphere mononukleäre Blutzellen, PHA: Phytohemagglutinin)

5 Diskussion

5.1 FSME-spezifische Immunität von FSME-geimpften Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen

Die untersuchten Patienten mit JIA und die gesunden Kontrollprobanden, die jeweils eine Grundimmunisierung gegen FSME erhalten hatten, zeigten eine ähnlich positive FSME-spezifische humorale und zelluläre Immunität.

Trotz dieser vergleichbaren Messwerte der humoralen und zellulären Immunität gegen FSME, gab es einige JIA Patienten, deren IgG-anti-FSME-Konzentration negativ oder nur grenzwertig waren, deren Anti-FSME-Antikörper nur intermediär avide waren, deren Neutralisationstiter negativ waren oder deren INF γ -ELISPOT Ergebnisse als definierter Non Responder resultierte. Niedrige humorale Parameter korrelierten jedoch nicht mit niedrigen Parametern der zellulären Immunität.

Bei einer Studie zur Varizella-zoster-Virus (VZV)-spezifischen Immunität bei immunsupprimierten Kindern nach Organtransplantation zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied der IgG-anti-VZV-Konzentration zwischen Patienten und gesunden Kontrollen. Es wurde in vier verschiedene Gruppen unterschieden: Patienten mit Lebertransplantation (LTx) und Nierentransplantation (KTx), welche entweder zwei Impfungen gegen VZV erhielten (vacc) oder in Kontakt mit dem Wildtyp gekommen waren (wt). In drei der vier Untergruppen (KTx(wt), LTx(wt) und LTx(vacc)) wurde eine signifikant niedrigere IgG-anti-VZV-Avidität als bei den gesunden Kontrollen gemessen. Die zelluläre Immunität wurde ebenfalls durch einen INF γ -ELISPOT bestimmt, welcher bei zwei der Patientenuntergruppen (LTx(vacc) und KTx(vacc)) eine signifikant niedrigere Zellantwort zeigte. Wie auch bei uns gab es insgesamt bei den organtransplantierten Patienten keine Korrelation zwischen der zellulären und humoralen Immunität (37). Dies wurde im Rahmen dieser Studie so interpretiert, dass die T-Zell-Antwort und die durch B-Zellen regulierte Impfantwort unabhängig voneinander funktioniert (37) (53).

Eine neuere Studie verglich die VZV-spezifische Immunität bei Patienten mit JIA, juveniler Dermatomyositis (JDM) und juveniler Sklerodermie (JScl) mit gesunden Kontrollen. Auch hier zeigte sich weder ein Unterschied der IgG-anti-VZV-Konzentration zwischen Patienten und Kontrollen noch eine Korrelation der humoralen

und zellulären Immunität. Bei der Bestimmung der humoralen Immunität wurde hier auf eine Antikörper-Avidität verzichtet (54).

Studien zur FSME-spezifischen Immunität bei Patienten nach Thymektomie ergaben einen verzögerten Anstieg der humoralen Immunantwort auf die FSME Impfung verglichen mit gesunden Individuen (43) (55). Um dies auf Patienten mit JIA zu beziehen, ist eine prospektive interventionelle Studie nötig, da die Bestimmung von humoralen und zellulären Parametern schon nach der Grundimmunisierung erfolgen müsste, um eine validere Aussage zu ergeben. Die Abstände zur Grundimmunisierung als auch der Aspekt, ob die Grundimmunisierung vor Diagnosestellung und somit vor Beginn der immunsuppressiven Therapie erfolgte, sind sehr heterogen und beeinträchtigen somit die Aussage der Ergebnisse.

Bisher gibt es noch keine Erfahrungen zu langzeitigen Verläufen der IgG-anti-FSME-Avidität bei Menschen. Es wurde gezeigt, dass die grundsätzliche Auswahl von hoch affinen Antikörpern und die Reifung der Antikörperavidität zeitlich unabhängig von Antikörperkonzentrationen stattfindet (56) (57), was den positiven Effekt der längeren Zeitspanne nach der primären Impfung auf die IgG-anti-FSME-Avidität bei unseren Patienten mit JIA unterstreicht.

Die Neutralisationstiter, welche als Ersatzmarker für die funktionalen FSME-neutralisierenden Antikörper dienen, waren in unserer Studie mit höheren IgG-anti-FSME-Konzentrationen sowohl bei JIA Patienten als auch bei den gesunden Kontrollen assoziiert. Dies unterstützt die Aussage über die Wichtigkeit von hohen Antikörperkonzentrationen für eine effiziente humorale Neutralisationsfähigkeit von FSME-spezifischen Antikörpern (58).

Durch die Verminderung der immunologischen Funktionen bei älteren Menschen haben diese signifikant niedrigere Antikörpertiter nach Impfungen als jüngere (59) (60). Eine Studie zeigte jedoch trotz quantitativer Verminderung der Antikörperproduktion keinen altersabhängigen Unterschied zwischen der IgG-anti-FSME-Avidität und der funktionellen Antikörperaktivität, welche durch Impfungen ausgelöst wird (61). Obwohl ältere Menschen also quantitativ weniger Antikörper nach Impfungen haben als jüngere, scheint sich dies nicht negativ auf die Qualität und somit Aktivität der Antikörper auszuwirken.

Auch von viralen Infektionen ist bekannt, dass der humorale immunologische Schutz im Allgemeinen von der Antikörperkonzentration abhängt, so lange die Avidität nicht im negativen Grenzbereich ist (62).

Dies zeigt also, dass die IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität nicht unbedingt miteinander korrelieren muss, um eine effektive Immunität zu gewährleisten. Eine Korrelation dieser zwei Parameter der humoralen Immunität ist in dieser Studie zwar zu sehen, aber mit $p=0,1187$ unterhalb der Signifikanzgrenze.

Die Nullhypothese, welche besagte, dass keine Korrelation zwischen der FSME-spezifischen zellulären Reaktivität und der IgG-anti-FSME-Konzentration bzw. –Avidität für die Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis besteht, konnte somit bestätigt werden.

5.2 Einfluss der Anzahl von FSME-Impfungen auf die FSME-spezifische Immunität

Auffallend war, dass die Anzahl der Impfungen und auch Anzahl der Boosterimpfungen nach der Grundimmunisierung eine bedeutende Auswirkung besonders auf neutralisierende Antikörper bei Patienten mit JIA und aber auch auf die IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität bei JIA Patienten und gesunde Kontrollen hatte. Die Gabe von Boosterimpfungen nach der Grundimmunisierung machte es wahrscheinlicher, dass Patienten mit JIA eine IgG-anti-FSME-Konzentration von über 165 VIEU/ml und mit einem RAI >60% eine hohe IgG-anti-FSME-Avidität hatten.

Auch auf zellulärer Ebene zeichnete sich ein ähnliches Bild ab. Von den High Respondern des INF γ -ELISPOTs hatten die meisten Patienten mit JIA und auch die Mehrzahl der gesunden Kontrollen mindestens eine Boosterimpfung bekommen. Während die INF γ -produzierenden Lymphozyten noch statistisch signifikant niedriger waren, wenn die Patienten bei der primären Impfung gegen FSME bereits an JIA erkrankt waren, zeigten die Ergebnisse des INF γ -ELISPOTs bei den JIA Patienten, welche erst nach der Boosterimpfung mit JIA diagnostiziert wurden, leicht höhere Werte verglichen mit den noch nicht erkrankten Patienten zu diesem Zeitpunkt.

Diese Ergebnisse zeigen die Wichtigkeit der Boosterimpfung und auch die ausreichende und termingerechte Gabe dieser Boosterimpfungen. In einer Studie zur Immunität gegen den Varizella-Zoster-Virus bei Patienten mit JIA zeigte sich, dass die IgG-anti-VZV-Konzentration signifikant höher war, wenn die Patienten zwei anstatt nur einer Impfung gegen VZV erhielten (54). Studien zur Impfantwort bei gesunden älteren Menschen kamen zu dem Ergebnis, dass frühere Boosterimpfungen gegen FSME zu höheren

Antikörperbildung führen (61) (63) (64) (65) (66). Außerdem ist eine hohe IgG-anti-FSME-Konzentration vor Durchführung der Boosterimpfung wichtig, um eine bessere Immunantwort auf die Impfung zu erzielen, was in der Studie durch die wahrscheinlich größere als bisher gedachte Wichtigkeit von langlebigen Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen bei der protektiven Immunität begründet wurde (66).

Der Abstand zwischen dem Abschluss der Grundimmunisierung und der ersten Boosterimpfung scheint ebenfalls den größten Einfluss auf die Neutralisationstiter von den Patienten mit JIA zu haben. Bei den gesunden Kontrollen war dahingegen eine niedrige IgG-anti-FSME-Konzentration mit einer längeren Zeit zwischen der abgeschlossenen Grundimmunisierung und der Anzahl an Boosterimpfungen assoziiert. In einer Studie mit gesunden Erwachsenen und verschiedener Anzahl von Boosterimpfungen gegen FSME zeigte sich allerdings, dass eine verspätete Boosterimpfung im Vergleich mit einer rechtzeitigen Gabe nicht in niedrigeren Konzentrationen von neutralisierenden Antikörpern resultierte (67). Eine andere Studie bei gesunden Erwachsenen kam zu dem Ergebnis, dass die Empfehlung für den Abstand von Boosterimpfungen vor allem in endemischen Gebieten angepasst werden muss, da das Risiko zwischen einer Infektion und einer zu kurzlebigen Immunität abgewogen werden muss (63).

Auch unsere Daten weisen darauf hin, dass vor allem Kindern und Jugendlichen mit juveniler idiopathischer Arthritis von rechtzeitigen Boosterimpfungen profitieren und somit eine adäquate humorale und auch zelluläre Immunität gegen FSME entwickeln können.

Was eine weitere Frage aufwirft, sind diejenigen JIA Patienten und gesunden Kontrollen, die trotz des Fehlens einer Impfung gegen FSME eine positive IgG-anti-FSME-Konzentration, hoch oder grenzwertig avide Antikörper gegen FSME oder eine zelluläre Immunität als Low Responder des INF γ -ELISPOTs zeigten. Eine Möglichkeit ist die einer Kreuzreaktion, da zu der Gruppe der Flaviviren, zu der auch das Frühsommer-Meningoencephalitis-Virus gehört, ebenfalls das Gelbfiebervirus, das Dengue-Fieber-Virus, das Louping-III-Virus, das Virus der japanischen B-Encephalitis und das West-Nil-Fieber-Virus zählen (6 S. 208). Eine Impfung existiert außer gegen FSME noch gegen das Gelbfieber und die japanische Encephalitis, aber auch durch eine vorherige Infektion mit einem Virus der Flaviviridae ist eine Kreuzreaktivität möglich (68). Die Flaviviren haben ein membrangebundenes Protein E, welches das Hauptziel von

virusneutralisierenden Antikörpern ist, welche sowohl nach natürlicher Infektion als auch nach Impfungen eine langzeitige Immunität vermitteln (69).

Eine Studie an Tieren zur Kreuzreaktion bei verschiedenen Viren der Flaviviridae ergab, dass eine Kreuzreaktion zwischen den FSME-Test-Kits und Seren bei Pferden bestand, die positiv für das West-Nil-Fieber-Virus waren, und ebenso zwischen den West-Nil-Fieber-Virus-ELISA-Kits und anderen Flaviviren (70). Die Autoren zogen die Schlussfolgerung, dass einerseits virusspezifische Neutralisationstests nötig sind, um das ursächliche Flavivirus zu bestimmen, und andererseits sei eine Kreuzreaktion eher selten und spielt nur eine untergeordnete Rolle in Ländern wie Deutschland, die keine Prävalenz einer umfangreichen Vielzahl von FSME-verwandten Flaviviren haben (70). Eine Studie an gesunden Erwachsenen und Patienten mit FSME ergab ebenfalls die Wichtigkeit der Durchführung von Neutralisationstest zur genauen Bestimmung der Art des Flavivirus (71).

Bei denjenigen Patienten mit JIA und gesunden Kontrollen, die keine FSME-Impfungen erhalten hatten, wurde kein Neutralisationstiter bestimmt, da dies in unserer Studie als Ausschlusskriterium definiert war und sie somit nicht miteingeschlossen wurden. Um eine Kreuzreaktion sicher zu bestätigen oder auszuschließen, wäre dies nötig. Auch eine prospektive interventionelle Studie wäre denkbar, in welcher man vor Gabe der ersten Impfung gegen FSME schon FSME-spezifische Bestimmungen der humoralen und zellulären Immunität anfertigt. Auch eine genauere Anamnese bezüglich Vorerkrankungen oder Impfungen bezüglich der verschiedenen Flaviviren sowie eine Reiseanamnese wären hilfreich.

5.3 Einfluss der Medikation auf die FSME-spezifische Immunität

Methotrexat und Biologika wie vor allem TNF α -Inhibitoren sind immunmodulatorische Medikamente, die zur Therapie bei JIA eingesetzt werden. Eine Studie, die den Einfluss von MTX auf die B-Lymphozyten des Immunsystems bei Kindern und Jugendlichen mit JIA untersuchte, zeigte, dass sich eine Therapie mit MTX negativ auf die transitorischen B-Zellen auswirkt und somit auf die frühe B-Zell Entwicklung im peripheren Blut (72). Außerdem zeigte die Studie, dass unter MTX Serumimmunglobuline in erniedrigten und folliculäre T-Helferzellen in leicht erhöhten Werten vorhanden sind. Ebenso wurde die Auswirkung von Etanercept, einem TNF α -Blocker, untersucht und festgestellt, dass kein

signifikanter Effekt auf B-Lymphozyten Subgruppen besteht, aber der B-Zell Überlebensfaktor BAFF in niedrigeren Werten vorliegt und follikuläre T-Helferzellen vermehrt im Blut zu finden sind (72). Follikuläre T-Helferzellen sind wichtig für die Bildung von hoch-affinen antigenspezifischen Antikörper und den Isotypenswitch der Antikörper (73).

Der Einfluss von immunmodulatorischen Medikamenten bei Kindern und Jugendlichen mit JIA auf die Wirksamkeit von Impfungen wurde unter anderem bei der sieben-valenten Pneumokokkenimpfung untersucht. Unter Therapie mit TNF α -Inhibitoren zeigte sich bei drei Serotypen der Pneumokokken ein erniedrigter Titer verglichen mit JIA Patienten, die keine TNF α -Blocker erhielten, insgesamt konnten aber positive protektive Titer gemessen werden (74). In einer prospektiven Studie bei Erwachsenen mit Rheumatoider Arthritis (RA) zeigte eine Therapie mit MTX einen negativen Einfluss auf die Anti-IgG-Konzentration nach der sieben-valenten Pneumokokkenimpfung, während eine Therapie mit TNF α -Inhibitoren keinen signifikanten Unterschied zu Kontrollen ohne immunmodulatorischer Therapie zeigte (75). Eine Studie bei Erwachsenen mit Psoriasisarthritis zeigte vergleichende Ergebnisse (76).

Unsere Daten zeigten ebenfalls einen Einfluss von MTX und TNF α -Blocker auf die humorale und zelluläre Immunität nach der FSME-Impfung bei JIA-Patienten. Während die Therapie mit Methotrexat bei der primären Impfung gegen FSME einen negativen und zum Zeitpunkt der Blutentnahme einen positiven Einfluss auf die IgG-anti-FSME-Konzentration zeigt, ist bei einer Therapie mit TNF α -Inhibitoren ein leicht positiver Effekt auf die höhere Anti-IgG-FSME-Konzentrationen zu sehen. Die anderen zwei Marker für die humorale Immunität, die IgG-anti-FSME-Avidität und Neutralisationstiter, wurden sowohl von MTX als auch von TNF α -Blockern negativ beeinflusst. Besonders ist hier der statistisch signifikante negative Einfluss von MTX auf die IgG-anti-FSME-Avidität während der primären FSME-Impfung und der statistisch signifikante negative Einfluss von TNF α -Inhibitoren auf die Neutralisationstiter zu erwähnen, jeweils verglichen mit Patienten ohne TNF α -Inhibitoren Therapie.

Dies entspricht auch den Ergebnissen einer prospektiven Studie zur FSME Impfung bei immunsuppremierten Patienten mit RA, in welcher eine Therapie mit MTX und TNF α -Inhibitoren zu einem negativen Effekt der Serokonversion und des Neutralisationstiter führte (42).

Auf zellulärer Ebene wurde vor allem die Wirkung der Influenza-Impfung auf Patienten mit RA unter TNF α -Inhibitor Therapie untersucht. Studien zeigten, dass INF γ -

produzierende regulatorische T-Lymphozyten (Tregs) einen Monat nach der Impfung anstiegen und nach sechs Monaten wieder abgefallen waren (77) (78). Auch bei Erwachsenen mit RA unter Rituximab und MTX Therapie konnte ein Anstieg der Influenza spezifischen CD4+ T-Lymphozyten festgestellt werden, wohingegen sich diese bei den gesunden Kontrollen eher verringerten (79). MTX erhöht bei Kindern und Jugendlichen mit JIA die CD4+ und CD8+ T-Zellproliferation sowie die INF γ -Konzentration im Plasma (80). TNF α hemmt hingegen die unterdrückende Funktion von regulatorischen T-Zellen, weshalb bei Patienten mit TNF α -Blocker Therapie eine erhöhte Anzahl von CD4+ T-Lymphozyten vorhanden ist und diese supprimierende Wirkung der Tregs wiederhergestellt wird (81) (82) (83).

Unsere Studie zeigte, dass sowohl eine Therapie mit MTX als auch mit TNF α -Inhibitoren einen vermeintlich positiv stimulierenden Effekt auf FSME-spezifische INF γ -produzierende T-Lymphozyten hatte, jedoch ohne statistische Signifikanz. Da es sich jedoch nicht um eine interventionelle Studie handelte, war der Abstand zwischen der Untersuchung und der letzten Impfung gegen FSME nicht gleich. Es liegt ebenfalls nur ein Messwert vom INF γ -ELISPOT pro Patient vor, was die Aussage der Ergebnisse limitieren könnte.

Insgesamt ist aber zu sagen, dass trotz dieser Einflüsse von MTX und TNF α -Inhibitoren auf die FSME-spezifische humorale und zelluläre Immunität bei Patienten mit JIA, alle gemessenen Parameter im positiven Bereich lagen und damit vergleichbar zu den Ergebnissen der gesunden Kontrollen und Patienten ohne immunmodulatorische Therapie waren.

5.4 Technische Limitationen

5.4.1 Heterogenität der JIA Population

Ein möglicher Schwachpunkt unserer Studie sind das Nichteinhalten der berechneten Fallzahlen in allen Versuchen. Zwar wurden insgesamt 100 JIA-Patienten und 31 gesunde Kontrollen rekrutiert, was 10 Patienten mehr und nur ein Kontrollproband weniger ist als berechnet wurde, aber vor allem bei Bestimmung des Neutralisationstiter und der zellulären Immunität durch INF γ – ELISPOTs konnten nicht alle Proben aus technischen Gründen, insbesondere Limitationen im verfügbaren Blutvolumen beziehungsweise zu geringer Zellzahl, verarbeitet werden.

Weiterhin handelt es sich bei der Gruppe der JIA Patienten um eine sehr heterogene Gruppe. Wie schon in der Einleitung aufgezeigt, ist die JIA nicht eine einzelne Krankheit, sondern besteht aus sieben teilweise sehr verschiedenen JIA-Subtypen. Auch gab es große Unterschiede bei der Medikation sowohl bei der Grundimmunisierung als auch bei der Blutentnahme beziehungsweise zum Zeitpunkt der Rekrutierung. Wenn die Grundimmunisierung schon etwas länger in der Vergangenheit lag, war es teilweise schwer, noch Dokumentationen zu der damals aktuellen Medikation zu erfassen. Soweit bekannt, wurde in den Berechnungen berücksichtigt, ob der Patient eventuell Biologika einnahm oder nur eine Therapie mit NSAIDs oder gar keine Medikation hatte. Die Gleichheit der Krankheitsaktivität wurde versucht, mittels Bestimmung der Entzündungswerte herzustellen. Weiter wurden immunologische Marker wie die ANAs, HLA B27 und der Rheumafaktor berücksichtigt, klinische Symptome oder eventuelle Bildgebung wurden nicht in die Analyse einbezogen.

5.4.2 Methoden abhängige Limitationen

Auch bei den verwendeten Methoden gibt es verschiedene Limitationen.

Die hoch positive IgG-anti-FSME-Konzentration wurde als > 1000 VIEU/ml definiert. Da dies Mittelwerte und Berechnungen beeinflusst, wurden diese dafür nicht mit einbezogen. Um genauere Mittelwerte bestimmen zu können und eine höhere Anzahl von Messungen in Berechnungen zu haben, müsste man die Seren dieser Probanden nochmal verdünnen, messen und das Ergebnis genauer beschreiben.

Der Neutralisationstiter wurde nur bei einigen Proben bestimmt, die eine positive IgG-anti-FSME-Konzentration hatten. Um mehr Aussagekraft zu haben, wäre es möglicherweise sinnvoll gewesen, auch Neutralisationstiter von Proben zu machen, die eine grenzwertige oder negative IgG-anti-FSME-Konzentration haben.

Bei Bestimmung der zellulären Immunität ergaben sich ebenfalls einige Beschränkungen. Bei jungen Patienten konnte teilweise nicht sehr viel Blut für unsere Studie abgenommen werden, da die Blutabnahmen im Rahmen einer Routineblutabnahme stattfanden. Hierdurch ergab sich die Situation, dass es nicht genügend PBMCs für die Durchführung eines ELISPOTs gab. Der ELISPOT wurde dann mit den wenigen vorhandenen Zellen durchgeführt und die Spot forming Units wurden auf eine Millionen Zellen/ml normalisiert.

Die Aufteilung in die verschiedenen Gruppen der Responder bei den ELISPOTs ergab sich anhand der Ergebnisse und ist angelehnt an die Responder und Non-Responder auf die Hepatitis B-Impfung (53), es gibt jedoch in der Literatur keinen validierten Cut-off für ELISPOT-Ergebnisse bezogen auf die FSME-Impfung.

Eine weitere Überlegung wäre, ob noch eine Analyse mittels Durchflusszytometrie nötig wäre, da dies eine Differenzierung zwischen den einzelnen T-Zell-Populationen und der B-Zell Maturation ermöglicht und möglicherweise noch weitere wichtige Informationen liefern würde.

5.5 Ausblick

Unsere Untersuchungen zeigen, dass Patienten mit JIA eine vergleichbare humorale und zelluläre Immunität auf die Impfung gegen FSME wie gesunde Kinder und Jugendliche haben. Somit kann die Empfehlung, dass JIA Patienten in FSME Risikogebieten eine FSME Impfung erhalten sollten, hinsichtlich der Wirksamkeit der Impfung unterstützt werden. Die Impfung gegen FSME ist serologisch ähnlich wirksam bei den Patienten mit JIA wie bei gesunden Kindern und Jugendlichen.

Zu überlegen und untersuchen gilt es, ob Boosterimpfungen bei Patienten mit JIA enghäufiger durchgeführt werden sollten. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass Boosterimpfungen sowohl auf humoraler als auch auf zellulärer Ebene eine positiv stimulierende Wirkung auf das Immunsystem haben. Vor allem auch bei einer Therapie mit Methotrexat und Biologika sind Booster wichtig, da diese das Immunsystem eventuell einschränken können. Boosterimpfungen gegen FSME sollten idealerweise vor Beginn einer immunsuppressiven Therapie durchgeführt werden.

Geplant ist eine ähnliche Analyse bei Erwachsenen mit Rheumatoider Arthritis, um unsere Ergebnisse in Zusammenhang zu stellen und eine Korrelation der FSME-Antikörper spezifischen Ergebnisse dieser zwei Krankheiten zu erarbeiten.

6 Zusammenfassung

Die juvenile idiopathische Arthritis (JIA) ist eine chronische entzündliche Autoimmunerkrankung des Kindesalters mit unbekannter Ätiologie. Die standardmäßigen Impfungen sind gemäß der aktuellen STIKO-Empfehlungen empfohlen.

Die Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME) ist eine durch Zecken übertragene Krankheit, die zu Fieber und neurologischen Symptomen führen kann. Eine kausale Therapie gibt es nicht, eine Impfung gegen FSME ist allerdings für Personen empfohlen, die in Risikogebieten leben oder diese bereisen.

Die vorliegenden Untersuchungen der IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität, des Neutralisationstiter und des INF γ -ELISPOTs umfassen die Daten von 100 JIA Patienten und 31 gesunden Kontrollen und überprüfen, ob die humorale und zelluläre Immunität gegen FSME von Patienten mit JIA vergleichbar mit der von gesunden Kontrollen ist.

Die Marker der humoralen Immunität waren vergleichbar zwischen den zwei untersuchten Gruppen. Sowohl bei der IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität als auch bei den Neutralisationstests waren die Mittelwerte beziehungsweise der Median bei den Patienten mit JIA niedriger verglichen mit den gesunden Kontrollprobanden. Bei den Ergebnissen des INF γ -ELISPOTs war es umgekehrt, aber niedrige humorale Parameter korrelierten nicht mit niedrigen Parametern der zellulären Immunität oder andersherum. Entsprechend der INF γ -ELISPOT Ergebnisse wurden die Patienten mit JIA und die gesunden Kontrollen in High, Low und Non Responder aufgeteilt. Prozentual gab es bei den gesunden Kontrollprobanden mehr Low und Non Responder. Insgesamt gab es keine statistisch relevante Korrelation zwischen der humoralen und zellulären Immunität.

Die Anzahl der Impfungen und auch Anzahl der Boosterimpfungen nach der Grundimmunisierung hatten eine bedeutende positive Auswirkung besonders auf neutralisierende Antikörper bei Patienten mit JIA und aber auch auf die IgG-anti-FSME-Konzentration und –Avidität sowie die zelluläre Immunität bei JIA Patienten und gesunde Kontrollen.

Eine Therapie mit TNF α -Inhibitoren beeinflusste den Neutralisationstiter bei den Patienten mit JIA signifikant negativ, wobei sich eine Therapie mit MTX signifikant negativ auf die IgG-anti-FSME-Avidität auswirkte.

Als Schlussfolgerung lässt sich sagen, dass die Impfung gegen FSME ebenso wirksam bei den Patienten mit JIA wie bei gesunden Kindern und Jugendlichen ist,

Boosterimpfungen bei Patienten mit JIA aber sehr wichtig sind und öfters empfohlen werden sollten.

7 Literaturverzeichnis

1. **Hütten, F.** Knochenjob. [Online] April 2017. [Zitat vom: 18. September 2017.] <http://www.sueddeutsche.de/gesundheit/gesundheit-knochenjob-1.3471575>.
2. **Prakken B, Albani S, Martini A.** Juvenile idiopathic arthritis. *The Lancet*. 2011, Bd. 377, S. 2138–2149.
3. **Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie.** Was ist "JIA"? [Online] 2016. [Zitat vom: 18. September 2017.] <https://gkjr.de/fuer-aerzte/krankheitsbilder/jia/was-ist-jia/>.
4. **Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 2012.** 263., neu bearb. und erw. Aufl. Berlin : De Gruyter, 2011. S. 2323. 978-3-11-025166-1.
5. **Parkin J, Cohen B.** An overview of the immune system. *The Lancet*. 2001, Bd. 357, S. 1777–1789.
6. **Hof H, Dörries R, Geginat G.** *Medizinische Mikrobiologie*. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart : Thieme, 2009. S. 731. 987-3-13-125314-9.
7. **Ravelli A, Martini A.** Juvenile idiopathic arthritis. *The Lancet*. 2007, Bd. 369, S. 767–778.
8. **Eisenstein EM, Berkun Y.** Diagnosis and classification of juvenile idiopathic arthritis. *Journal of autoimmunity*. 2014, Bde. 48-49, S. 31–33.
9. **Borchers A, Selmi C, Cheema G, Keen CL, Shoenfeld Y, Gershwin ME.** Juvenile idiopathic arthritis. *Autoimmunity reviews*. 2006, Bd. 5, 4, S. 279–298.
10. **Zonneveld-Huijssoon E, Ronaghy A, Van Rossum MA, Rijkers GT, Van der Klis F, Sanders EA, Vermeer-de Bondt P, Hoes AW, Van der Net J, Engels C, Kuis W, Prakken BJ, Van Tol MJ, Wulffraat NM.** Safety and efficacy of meningococcal c vaccination in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2007, Bd. 56, 2, S. 639–646.
11. **Heijstek MW, Pileggi GC, Zonneveld-Huijssoon E, Armbrust W, Hoppenreijts E, Uiterwaal C, Kuis W, Wulffraat NM.** Safety of measles, mumps and rubella vaccination in juvenile idiopathic arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007, Bd. 66, 10, S. 1384–1387.
12. **Ronaghy A, de Jager W, Zonneveld-Huijssoon E, Klein MR, Van Wijk F, Rijkers GT, Kuis W, Wulffraat NM, Prakken BJ.** Vaccination leads to an aberrant FOXP3 T-cell response in non-remitting juvenile idiopathic arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011, Bd. 70, 11, S. 2037–2043.
13. **Prahalad S, Ryan MH, Shear ES, Thompson SD, Glass DN, Giannini EH.** Twins concordant for juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2000, Bd. 43, 11, S. 2611–2612.

14. **Murray KJ, Luyrink L, Grom AA, Passo MH, Emery H, Witte D, Glass DN.** Immunohistological characteristics of T cell infiltrates in different forms of childhood onset chronic arthritis. *Journal of Rheumatology*. 1996, Bd. 12, S. 2116–2124.
15. **Lotito AP, Campa A, Silva CA, Kiss MH, Mello SB.** Interleukin 18 as a marker of disease activity and severity in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Journal of Rheumatology*. 2007, Bd. 34, 4, S. 823–830.
16. **Pignatti P, Vivarelli M, Meazza C, Rizzolo MG, Martini A, De Benedetti.** Abnormal regulation of interleukin 6 in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Journal of Rheumatology*. 2001, Bd. 28, 7, S. 1670–1676.
17. **Gattorno M, Gerloni V, Morando A, Comanducci F, Buoncompagni A, Picco P, Fantini F, Pistoia V, Gambini C.** Synovial membrane expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor 1 in juvenile idiopathic arthritides. *Journal of Rheumatology*. 2002, Bd. 29, 8, S. 1774–1779.
18. **Niehues T.** Aktualisierte, interdisziplinäre S2-Therapieleitlinie der Juvenilen idiopathischen Arthritis (2. Auflage). [Online] 2011. [Zitat vom: 18. September 2017.] http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/027-0201_S2K_Juvenile_Idiopathische_Arthritis_2011-10_abgelaufen.pdf.
19. **Dueckers G, Guellac N, Arbogast M, Dannecker G, Foeldvari I, Frosch M, Ganser G, Heiligenhaus A, Horneff G, Illhardt A, Kopp I, Krauspe R, Markus B, Michels H, Schneider M, Singendonk W, Sitter H, Spamer M, Wagner N, Niehues T.** Evidence and consensus based GKJR guidelines for the treatment of juvenile idiopathic arthritis. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*. 2012, Bd. 142, 2, S. 176–193.
20. **Wallace, C. A.** Current management of juvenile idiopathic arthritis. *Best practice & research. Clinical rheumatology*. 2006, Bd. 20, 2, S. 279–300.
21. **Minden K, Frosch M, Roth J, Ganser G, Dannecker G, Girschick HJ, Huemer C, Heiligenhaus A, Neudorf U, Roth J.** Juvenile idiopathische Arthritis. [Hrsg.] Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie.
22. **Beukelman T, Xie F, Chen L, Baddley JW, Delzell E, Grijalva CG, Lewis JD, Ouellet-Hellstrom R, Patkar NM, Saag KG, Winthrop KL, Curtis JR.** Rates of hospitalized bacterial infection associated with juvenile idiopathic arthritis and its treatment. *Arthritis and rheumatism*. 2012, Bd. 64, 8, S. 2773–2780.
23. **Minden K, Speth F, Huppertz HI, Borte M.** Sinnvolle Impfprävention bei Kindern und Jugendlichen mit rheumatischen und muskuloskelettalen Erkrankungen. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2014, Bd. 73, 10, S. 878–889.
24. **Gesellschaft für Kinder- und Jugendrheumatologie.** Impfungen bei Kindern und Jugendlichen mit rheumatischen Erkrankungen. [Online] Oktober 2013. [Zitat vom: 18. September 2017.] http://www.gkjr.de/fileadmin/user_upload/Dokumente/Impfungen/impftabelle_web.pdf.
25. **Heijstek MW, Ott de Bruin LM, Bijl M, Borrow R, van der Klis F, Koné-Paut I, Fasth A, Minden K, Ravelli A, Abinun M, Pileggi GS, Borte M, Wulffraat NM.**

EULAR recommendations for vaccination in paediatric patients with rheumatic diseases. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011, Bd. 70, 10, S. 1704–1712.

26. **Minden K, Niewerth M, Borte M, Singendonk W, Haar JP.** Impfungen bei rheumatischen Erkrankungen des Kindes- und Jugendalters. *Zeitschrift für Rheumatologie*. 2007, Bd. 66, 2, S. 111-2, 114-8, 120.

27. **Stiasny, Karin, Holzmann, Heidemarie und Heinz, Franz X.** Characteristics of antibody responses in tick-borne encephalitis vaccination breakthroughs. *Vaccine*. 2009, Bd. 27, 50, S. 7021–7026.

28. **Robert Koch Institut.** Epidemiologisches Bulletin. *FSME: Risikogebiete in Deutschland (Stand: April 2017)*. [Online] 27. April 2017. [Zitat vom: 18. September 2017.]
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2017/Ausgaben/17_17.pdf?__blob=publicationFile.

29. **Robert Koch Institut.** Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut/Stand: August 2015. *Epidemiologisches Bulletin*. August 2015. 34/2015.

30. **Robert Koch Institut.** Antworten auf häufig gestellte Fragen zur FSME-Impfung. [Online] November 2012. [Zitat vom: 18. September 2017.]
<http://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/FSME/FSME-Impfung/FSME-Impfung.html>.

31. **Turvey SE, Broide D. H.** Innate immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010, Bd. 125, 2 Suppl 2, S. S24-32.

32. **Bonilla FA, Oettgen H. C.** Adaptive immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010, Bd. 125, 2 Suppl 2, S. S33-40.

33. **Leo, Oberdan, Cunningham, Anthony und Stern, Peter L.** Vaccine immunology. *Perspectives in Vaccinology*. 2011, Bd. 1, 1, S. 25–59.

34. **Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S.** *Cellular and molecular immunology*. Ninth edition. Philadelphia, Pa. : Elsevier, 2018. S. 565. 0323479782.

35. **Sehra S, Yao W, Nguyen ET, Glosson-Byers NL, Akhtar N, Zhou B, Kaplan MH.** TH9 cells are required for tissue mast cell accumulation during allergic inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015, Bd. 136, 2, S. 433-40.e1.

36. **Azizi G, Simhag A, M-M-El Rouby N, Mirshafiey A.** Th22 Cells Contribution in Immunopathogenesis of Rheumatic Diseases. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*. 2015, Bd. 14, 3, S. 246–254.

37. **Prelog M, Schönlaub J, Jeller V, Almanzar G, Höfner K, Gruber S, Eiwegger T, Würzner R.** Reduced varicella-zoster-virus (VZV)-specific lymphocytes and IgG antibody avidity in solid organ transplant recipients. *Vaccine*. 2013, Bd. 31, 20, S. 2420–2426.

38. **Mosser, David M. und Edwards, Justin P.** Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology*. 2008, Bd. 8, 12, S. 958–969.

39. **Du Clos TW.** Function of C-reactive protein. *Annals of Internal Medicine.* 2000, Bd. 32, 4, S. 247–248.
40. **Ricklin D, Lambris J. D.** Complement-targeted therapeutics. *Nature biotechnology.* 2007, Bd. 25, 11, S. 1265–1275.
41. **Hainz U, Jenewein B, Asch E, Pfeiffer KP, Berger P, Grubeck-Loebenstein B.** Insufficient protection for healthy elderly adults by tetanus and TBE vaccines. *Vaccine.* 2005, Bd. 23, 25, S. 3232–3235.
42. **Hertzell KB, Pauksens K, Rombo L, Knight A, Vene S, Askling HH.** Tick-borne encephalitis (TBE) vaccine to medically immunosuppressed patients with rheumatoid arthritis. *Vaccine.* 2016, Bd. 34, 5, S. 650–655.
43. **Prelog M, Wilk C, Keller M, Karall T, Orth D, Geiger R, Walder G, Laufer G, Cottogni M, Zimmerhackl Lothar B, Stein J, Grubeck-Loebenstein B, Wuerzner R.** Diminished response to tick-borne encephalitis vaccination in thymectomized children. *Vaccine.* 2008, Bd. 26, 5, S. 595–600.
44. **World Medical Association.** World Medical Association Declaration of Helsinki. *JAMA.* 2013, Bd. 310, 20, S. 2191–2194.
45. **Petty RE.** Growing pains: the ILAR classification of juvenile idiopathic arthritis. *The Journal of Rheumatology.* 2001, Bd. 28, 5, S. 927–928.
46. **Kneitz RH, Schubert J, Tollmann F, Zens W, Hedman K, Weissbrich B, et al.** A new method for determination of varicella-zoster virus immunoglobulin G avidity in serum and cerebrospinal fluid. *BMC infectious diseases.* 2004, Bd. 4, S. 33.
47. **Hagemann O.** Laborlexikon. (ISSN 1860-966X). [Online] 2004. <http://www.laborlexikon.de/>.
48. **Wigger D und Stange M.** *Medikamente in der Pädiatrie.* [Hrsg.] Dietmar Wigger und Markus Stange. 5., überarbeitete und aktualisierte Auflage. München, Deutschland : Elsevier, 2017. S. 1. Bd. 46. 978-3-437-21455-4.
49. **Actemra®.** [Online] 26.09.2018. [Zitat vom: 18. Oktober 2018.] <https://compendium.ch/mpro/mnr/20040/html/de?start=1#7100>.
50. **Arava®.** [Online] 26.07.2016. [Zitat vom: 18. Oktober 2018.] <https://compendium.ch/mpro/mnr/8383/html/de#7150>.
51. **Plaquenil®.** [Online] 08.08.2017. [Zitat vom: 18. Oktober 2018.] <https://compendium.ch/mpro/mnr/3083/html/de#7150>.
52. **Kineret®.** [Online] [Zitat vom: 18. Oktober 2018.] https://sobi-deutschland.de/sites/sobi-deutschland.de/files/2018-05/Fachinformation_Kineret.pdf.
53. **Garner-Spitzer E, Wagner A, Paulke-Korinek M, Kollaritsch H, Heinz FX, Redlberger-Fritz M, Stiasny K, Fischer GF, Kundi M, Wiedermann U.** Tick-borne encephalitis (TBE) and hepatitis B nonresponders feature different immunologic mechanisms in response to TBE and influenza vaccination with involvement of

regulatory T and B cells and IL-10. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2013, Bd. 191, 5, S. 2426–2436.

54. Groot N, Pileggi G, Sandoval CB, Grein I, Berbers G, Ferriani VPL, Wulffraat N, de Roock S. Varicella vaccination elicits a humoral and cellular response in children with rheumatic diseases using immune suppressive treatment. *Vaccine*. 2017, Bd. 35, 21, S. 2818–2822.

55. Zlomy M, Würzner R, Holzmann H, Brandstätter A, Jeller V, Zimmerhackl LB, Prelog M. Antibody dynamics after tick-borne encephalitis and measles-mumps-rubella vaccination in children post early thymectomy. *Vaccine*. 2010, Bd. 28, 51, S. 8053–8060.

56. Dengler TJ, Zimmermann R, Meyer J, Sack FU, Girgsdies O, Kübler WE. Vaccination against tick-borne encephalitis under therapeutic immunosuppression. Reduced efficacy in heart transplant recipients. *Vaccine*. 1999, Bd. 17, 7-8, S. 867–874.

57. Pichichero ME, Voloshen T, Zajac D, Passador S. Avidity maturation of antibody to *Haemophilus influenzae* type b (Hib) after immunization with diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hib-hepatitis B combined vaccine in infants. *The Journal of infectious diseases*. 1999, Bd. 180, 4, S. 1390–1393.

58. Holzmann H, Kundi M, Stiasny K, Clement J, McKenna P, Kunz C, Heinz FX. Correlation between ELISA, hemagglutination inhibition, and neutralization tests after vaccination against tick-borne encephalitis. *Journal of Medical Virology*. 1996, Bd. 48, 1, S. 102–107.

59. Weinberger B, Herndler-Brandstetter D, Schwanninger A, Weiskopf D, Grubeck-Loebenstein B. Biology of immune responses to vaccines in elderly persons. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008, Bd. 46, 7, S. 1078–1084.

60. Chen WH, Kozlovsky BF, Effros RB, Grubeck-Loebenstein B, Edelman R, Sztejn MB. Vaccination in the elderly. *Trends in immunology*. 2009, Bd. 30, 7, S. 351–359.

61. Stiasny K, Aberle JH, Keller M, Grubeck-Loebenstein B, Heinz FX. Age affects quantity but not quality of antibody responses after vaccination with an inactivated flavivirus vaccine against tick-borne encephalitis. *PloS one*. 2012, Bd. 7, 3, S. e34145.

62. Bachmann MF, Kalinke U, Althage A, Freer G, Burkhart C, Roost HP, Aguet M, Hengartner H, Zinkernagel RM. The Role of Antibody Concentration and Avidity in Antiviral Protection. *Science*. 1997, Bd. 276, 5321, S. 2024–2027.

63. Paulke-Korinek M, Rendi-Wagner P, Kundi M, Laaber B, Wiedermann U, Kollaritsch H. Booster vaccinations against tick-borne encephalitis. *Vaccine*. 2009, Bd. 27, 50, S. 7027–7030.

64. Weinberger B, Keller M, Fischer KH, Stiasny K, Neuner C, Heinz FX, Grubeck-Loebenstein B. Decreased antibody titers and booster responses in tick-borne encephalitis vaccinees aged 50-90 years. *Vaccine*. 2010, Bd. 28, 20, S. 3511–3515.

- 65. Rendi-Wagner P, Paulke-Korinek M, Kundi M, Wiedermann U, Laaber B, Kollaritsch H.** Antibody persistence following booster vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine*. 2007, Bd. 25, 27, S. 5097–5101.
- 66. Kaml M, Weiskirchner I, Keller M, Luft T, Hoster E, Hasford J, Young L, Bartlett B, Neuner C, Fischer KH, Neuman B, Würzner R, Grubeck-Loebenstein B.** Booster vaccination in the elderly. *Vaccine*. 2006, Bd. 24, 47-48, S. 6808–6811.
- 67. Askling HH, Insulander M, Hergens MP, Leval A.** Tick borne encephalitis (TBE)-vaccination coverage and analysis of variables associated with vaccination, Sweden. *Vaccine*. 2015, Bd. 33, 38, S. 4962–4968.
- 68. Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, Li L, Barrett AD, Smith DJ, Galbraith SE, Solomon T, Fooks AR.** Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *The Journal of general virology*. 2011, Bd. 92, Pt 12, S. 2821–2829.
- 69. Zlatkovic J, Stiasny K, Heinz FX.** Immunodominance and functional activities of antibody responses to inactivated West Nile virus and recombinant subunit vaccines in mice. *Journal of virology*. 2011, Bd. 85, 5, S. 1994–2003.
- 70. Klaus C, Ziegler U, Kalthoff D, Hoffmann B, Beer M.** Tick-borne encephalitis virus (TBEV) - findings on cross reactivity and longevity of TBEV antibodies in animal sera. *BMC veterinary research*. 2014, Bd. 10, S. 78.
- 71. Venturi G, Martelli P, Mazzolini E, Fiorentini C, Benedetti E, Todone D, Villalta D, Fortuna C, Marchi A, Minelli G, Ciufolini MG.** Humoral immunity in natural infection by tick-borne encephalitis virus. *Journal of Medical Virology*. 2009, Bd. 81, 4, S. 665–671.
- 72. Glaesener S, Quách TD, Onken N, Weller-Heinemann F, Dressler F, Huppertz HI, Thon A, Meyer-Bahlburg A.** Distinct effects of methotrexate and etanercept on the B cell compartment in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*. 2014, Bd. 66, 9, S. 2590–2600.
- 73. Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG.** Follicular helper T cells. *Immunity*. 2009, Bd. 30, 3, S. 324–335.
- 74. Farmaki E, Kanakoudi-Tsakalidou F, Spoulou V, Trachana M, Pratsidou-Gertsis P, Tritsoni M, Theodoridou M.** The effect of anti-TNF treatment on the immunogenicity and safety of the 7-valent conjugate pneumococcal vaccine in children with juvenile idiopathic arthritis. *Vaccine*. 2010, Bd. 28, 31, S. 5109–5113.
- 75. Kapetanovic MC, Roseman C, Jönsson G, Truedsson L, Saxne T, Geborek P.** Antibody response is reduced following vaccination with 7-valent conjugate pneumococcal vaccine in adult methotrexate-treated patients with established arthritis, but not those treated with tumor necrosis factor inhibitors. *Arthritis and rheumatism*. 2011, Bd. 63, 12, S. 3723–3732.
- 76. Mease PJ, Ritchlin CT, Martin RW, Gottlieb AB, Baumgartner SW, Burge DJ, Whitmore JB.** Pneumococcal vaccine response in psoriatic arthritis patients during treatment with etanercept. *Journal of Rheumatology*. 2004, Bd. 31, 7, S. 1356–1361.

- 77. Salemi S, Picchianti-Diamanti A, Germano V, Donatelli I, Di Martino A, Facchini M, Nisini R, Biselli R, Ferlito C, Podestà E, Cappella A, Milanetti F, Rossi F, Amodeo R, Tabacco F, Di Rosa R, Laganà B, D'Amelio R.** Influenza vaccine administration in rheumatoid arthritis patients under treatment with TNFalpha blockers. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*. 2010, Bd. 134, 2, S. 113–120.
- 78. Milanetti F, Germano V, Nisini R, Donatelli I, Di Martino A, Facchini M, Ferlito C, Cappella A, Crialesi D, Caporuscio S, Biselli R, Rossi F, Salemi S, D'Amelio R.** Safety and immunogenicity of co-administered MF59-adjuvanted 2009 pandemic and plain 2009-10 seasonal influenza vaccines in rheumatoid arthritis patients on biologicals. *Clinical and experimental immunology*. 2014, Bd. 177, 1, S. 287–294.
- 79. Arad U, Tzadok S, Amir S, Mandelboim M, Mendelson E, Wigler I, Sarbagil-Maman H, Paran D, Caspi D, Elkayam O.** The cellular immune response to influenza vaccination is preserved in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab. *Vaccine*. 2011, Bd. 29, 8, S. 1643–1648.
- 80. Bulatović Čalasan M, Vastert SJ, Scholman RC, Verweij F, Klein M, Wulffraat NM, Prakken BJ, van Wijk F.** Methotrexate treatment affects effector but not regulatory T cells in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2015, Bd. 54, 9, S. 1724–1734.
- 81. Möttönen M, Heikkinen J, Mustonen L, Isomäki P, Luukkainen R, Lassila O.** CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental immunology*. 2005, Bd. 140, 2, S. 360–367.
- 82. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE.** TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood*. 2006, Bd. 108, 1, S. 253–261.
- 83. Sarkar S, Fox D. A.** Regulatory T cell defects in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2007, Bd. 56, 3, S. 710–713.

8 Anhang

8.1 Eigenleistung

Rekrutierung der Patienten mit JIA und der Kontrollprobanden. Anfertigung der Ficoll Dichtegradzentrifugation und der ELISAs zur Bestimmung der Anti-IgG-FSME-Avidität. Etablierung des Protokolls zum INF γ – ELISPOT und dessen Auswertung. Durchführung der ELISPOTs. Statistische Auswertung. Diskussion der Daten.

8.2 Danksagung

Mein Dank gilt besonders Frau Prof. Dr. med. Martina Prelog, die mir an ihrem eigenen Beispiel die Faszination zur Wissenschaft gezeigt hat und meine eigene Begeisterung für das Fach Pädiatrie und die Kinderrheumatologie weiter gefördert hat. Ihre ständige Anwesenheit und Erreichbarkeit sowie alle Hinweise und Korrekturen haben diese Dissertation ermöglicht. Besonders bedanken möchte ich mich auch für die Unterstützung bei jeglicher Art von Bewerbungen und das Schreiben von Empfehlungsschreiben.

Weiter danke ich Dr. rer. nat. Giovanni Almanzar für das Beantworten aller meiner Fragen bezüglich Material und Methoden sowie die Unterstützung und Anleiten der Versuche. Vielen Dank für die Geduld und unermüdlichen Erklärungen im Labor. Seine anregende Diskussion und das Hinterfragen der Daten haben meine Dissertation bereichert. Für die Einführung ins Labor und die Unterstützung bei Versuchen möchte ich mich bei MTA Kerstin Höfer bedanken und bei dem ganzen Team des Kinderrheumalabors für die familiäre Stimmung.

Außerdem möchte ich Frau Dr. med. Annette Holl-Wieden dafür danken, dass ich über Monate hinweg mit ihr in der rheumatologischen Ambulanz der Kinderklinik der Universität Würzburg Probanden mit JIA rekrutieren konnte, sowie über die praktischen klinischen Untersuchungen.

Ich danke Ricarda Stern, deren Unterstützung bei der gemeinsamen Rekrutierung der Patienten und vielen Versuchen sowie der gesamten Zeit im Labor sehr wertvoll war.

Bei den Patienten und Patientinnen sowie deren Eltern möchte ich mich bedanken, dass sie an dieser Studie teilgenommen haben.

Zuletzt gilt mein Dank noch meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden für die ununterbrochene Unterstützung und das außerordentliche Verständnis.

8.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtstag: 22. Juni 1991
Geburtsort: München

Weiterbildung

Seit 08/2019 Assistenzärztin in der Pädiatrie im Kantonsspital Winterthur, Schweiz
12/2017 – 05/2019 Assistenzärztin in der Allgemein Chirurgie im Spital Uster, Schweiz

Ausbildung

05/2011 – 07/2017 Medizinstudium an der Julius-Maximilian-Universität Würzburg
1. Staatsexamen im Frühjahr 2013
2. Staatsexamen (1. Teil) im Frühjahr 2016
2. Staatsexamen (2. Teil) im Frühjahr 2017
09/2008 – 06/2010 Gymnasium Grafing: Abitur 2010
09/2007 – 06/2008 Auslandsjahr an der Norco High School, CA, USA
09/2001 – 07/2007 Gymnasium Grafing

Praktische Erfahrungen

01 – 03/2017 Pädiatrie Tertial (PJ) im Universitätskinderspital beider Basel, Schweiz
09 – 12/2016 Innere Medizin Tertial (PJ) im Hôpital de la Timone, Marseille, Frankreich
05 – 08/2016 Chirurgie Tertial (PJ) im Luzerner Kantonsspital, Schweiz
08/2015 Famulatur in der Anästhesiologie, Universitätsklinik Würzburg
08/2014 Ambulanzfamulatur in der Universitätskinderklinik Würzburg
02 – 03/2014 Famulatur in der Kinderklinik München Schwabing
08/2013 Hausarztfamulatur in Grafing bei München

Sprachen

Deutsch Muttersprache
Englisch Sprachlevel C2
Französisch Sprachlevel C1