



**Entwicklung funktioneller Immunassays zur Detektion der humanen
Immunantwort auf das opportunistische Pathogen *Aspergillus fumigatus***

**Development of functional immunoassays to study human host
responses to the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus***

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Sektion Infektion und Immunität

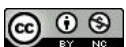
Vorgelegt von

Chris David Lauruschkat

aus

Bergisch Gladbach

Würzburg **2022**



Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Markus Sauer

1. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Löffler

2. Betreuer: Prof. Dr. med. Michael Hudecek

3. Betreuer: Priv.-Doz. Dr. med. Niklas Beyersdorf

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2017 bis Juli 2021 in der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Würzburg in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jürgen Löffler angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Der Schimmelpilz <i>Aspergillus fumigatus</i> und seine Bedeutung als opportunistisches Humanpathogen.....	5
1.1.1 Morphologie und Vorkommen von <i>A. fumigatus</i>	5
1.2 <i>A. fumigatus</i> -assoziierte Erkrankungen	6
1.2.1 Die invasive Aspergillose (IA).....	7
1.2.2 Die Chronische pulmonale Aspergillose (CPA).....	9
1.2.3 Allergische Aspergillose.....	11
1.2.3.1 Die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA).....	11
1.2.3.2 Allergische umweltassoziierte <i>Aspergillus</i> -Krankheitsbilder	12
1.3 Die Immunantwort auf <i>A. fumigatus</i>	14
1.3.1 Physiologische innate Immunreaktion gegen <i>A. fumigatus</i>	14
1.3.2 Die adaptive Immunantwort: Ein Exkurs in die Welt der T-Zell-Antwort und -Proliferation	16
1.3.3 CD4 ⁺ T-Zellen	19
1.3.4 T-Zell-Antwort auf <i>A. fumigatus</i>	21
1.4 Die T-Zell-Antwort als diagnostischer Marker	28
1.4.1 Einführung in die funktionellen T-Zell-Assays	28
1.4.2 T-Zell-Assays in der Klinik	30
1.4.3 Experimentelle T-Zell-Assays in der Diagnostik für invasive Mykosen und Schimmelpilz-Sensitivierung.....	32

1.5	Zielsetzung	38
2	Materialien und Methoden	41
2.1	Materialien.....	41
2.1.1	Technische Ausrüstung	41
2.1.1.1	Kühl- und Gefrierschränke	41
2.1.1.2	Vortexer.....	41
2.1.1.3	Heizblock.....	41
2.1.1.4	Zentrifugen.....	41
2.1.1.5	Sterilwerkbank.....	42
2.1.1.6	Inkubatoren	42
2.1.1.7	Geräte und Materialien zur Dosierung von Flüssigkeiten	42
2.1.1.8	Waagen.....	43
2.1.1.9	Reaktions- und Kryogefäße.....	43
2.1.1.10	Materialien zur Blutabnahme	43
2.1.1.11	Materialien für Zellisolation und -kultur.....	44
2.1.1.12	Geräte und Materialien zur Zellzählung.....	44
2.1.1.13	Geräte und Materialien für die Durchflusszytometrie.....	44
2.1.1.14	Geräte und Materialien für den ELISPOT.....	45
2.1.1.15	Geräte und Materialien für den ELISA und Multiplex-Zytokinassays	45
2.1.2	Reagenzien.....	46
2.1.2.1	Reagenzien und Kits zur Herstellung und Qualitätskontrolle von Zellstimulanzen	46
2.1.2.2	Reagenzien und Materialien für die Zellisolation und -kultur.....	46
2.1.2.3	Reagenzien und Kits für Immunfluoreszenzfärbungen	47

2.1.3	Software	50
2.2	Methoden.....	51
2.2.1	Probandenakquise und Klassifizierung	51
2.2.2	Akquise von Blutspendern und Klassifizierung der Schimmelpilzexposition	51
2.2.2.1	Blutentnahme	54
2.2.3	Herstellung der Stimuli und Stimulusqualitätskontrollen.....	54
2.2.3.1	Herstellung von <i>A. fumigatus</i> -Myzellysat und -Proteinantigenen.....	54
2.2.3.2	Endotoxinmessung von <i>A. fumigatus</i> -Myzellysat und -Proteinantigenen	55
2.2.4	PBMC-basierte Methoden	56
2.2.4.1	Gewinnung von autologem Serum.....	56
2.2.4.2	PBMC-Isolation, -Quantifikation und -Viabilitätskontrolle	56
2.2.4.3	PBMC-Kryokonservierung.....	57
2.2.4.4	Zelluläre Komposition und durchflusszytometrische Viabilitätsbestimmung ...	59
2.2.4.5	PBMC-Stimulation und -Ernte für die PBMC-basierte Durchflusszytometrie....	62
2.2.4.6	<i>A. fumigatus</i> -spezifische T-Zell-Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie .	62
2.2.4.7	Messung und Analyse der durchflusszytometrischen Daten.....	63
2.2.4.8	ELISPOT.....	64
2.2.5	VB-basierte Methoden	66
2.2.5.1	Vorbereitung von Stimulationsröhrchen für Vollblut-ELISA und Vollblut-basierte Durchflusszytometrie	66
2.2.5.2	VB-ELISA.....	67
2.2.5.3	Konventionelle ELISA-Analysen.....	67
2.2.5.4	T-Zell-Depletion.....	70
2.2.5.5	VB-basierte Durchflusszytometrie	70

2.2.6	PBMC- und VB-basierte Methoden.....	73
2.2.6.1	MILLIPLEX Multiplex Assays mittels Luminex-Technologie	73
2.2.7	Statistik.....	74
2.2.7.1	Signifikanzprüfung	74
2.2.7.2	Bestimmung von technischen Variationsparametern	74
2.2.7.3	Bestimmung der diagnostischen Leistung von Immun-Assays (ROC-Analyse)	77
2.2.7.4	Random Forest-Analyse	77
2.2.7.5	Datenanalyse und Datenvisualisierung	77
3	Resultate.....	79
3.1	Kapitel 1: Susceptibility of <i>A. fumigatus</i> -specific T-cell assays to pre-analytic blood storage and PBMC cryopreservation greatly depends on readout platform and analytes.	81
3.1.1	Supplement.....	94
3.2	Kapitel 2: Development of a simple and robust whole blood assay with dual co-stimulation to quantify the release of T-cellular signature cytokines in response to <i>Aspergillus</i> antigens.....	115
3.2.1	Supplement.....	131
3.3	Kapitel 3: Chronic occupational mold exposure drives expansion of <i>Aspergillus</i> -reactive type 1 and type 2 T-helper cell responses.	135
3.3.1	Supplement.....	151
3.4	Kapitel 4: T-Cell Immune Surveillance in Allogenic Stem Cell Transplant Recipients: Are Whole Blood-Based Assays Ready to Challenge ELISPOT?	162
3.4.1	Supplement.....	169
4	Diskussion	191
4.1	Wissensstand vor den Erkenntnissen der Dissertation.....	191
4.2	Kriterien für einen klinisch anwendbaren T-Zell-Test für <i>A. fumigatus</i>	193

4.2.1	Reproduzierbarkeit und Akkuratheit der Testergebnisse	194
4.2.2	Präanalytische Lagerzeiten und Transport.....	196
4.2.3	Kryokonservierung	201
4.2.4	CD4 (Th-Zell)-Normalisierung.....	203
4.2.5	Komplexität der Laborausstattung und benötigtes Fachwissen	205
4.3	Stimulationsumfeld.....	207
4.4	Kostimulation zur Verbesserung der Stimulationsumgebung in T-Zell-Assays	207
4.5	Unterschiede zwischen PBMC- und VB-basierten <i>A. fumigatus</i> -T-Zell-Assays	211
4.6	Auswahl sowie Herstellung von <i>A. fumigatus</i> -Antigenen und der Einfluss von Endotoxinen auf funktionelle T-Zell-Assays.....	212
4.7	Anwendungsgebiete und Limitationen für T-Zell-Assays in der experimentellen und klinischen Mykologie.....	214
4.8	Potenzieller Nutzen von funktionellen T-Zell-Assays als surrogative Marker in der Diagnose von Schimmelpilz-assoziierten Krankheiten	220
4.9	Perspektiven für die klinische Anwendung des VB-ELISA-Konzepts in der klinischen Mykologie.....	222
4.10	Konklusion	225
4.11	<i>Disclaimer</i> (Haftungsausschluss)	227
4.12	Dankwort.....	227
5	Referenzen	229
6	Appendix	247
6.1	Review-Artikel „Immunomodulation as a Therapy for <i>Aspergillus</i> Infection: Current Status and Future Perspectives.“	247
6.2	Probandenerfassungsbogen.....	266
6.3	Fragebogen zur Erfassung der Schimmelpilzexposition.....	268

6.4	Tabellenverzeichnis für Kapitel 1, 2 und 4.....	273
6.5	Abbildungsverzeichnis für Kapitel 1, 2 und 4.....	276
6.6	Abkürzungsverzeichnis.....	278
6.7	Publikationsliste.....	283
6.8	“Dissertation Based on Several Published Manuscripts“ Statement of individual author contributions and of legal second publication rights	286
6.9	“Dissertation Based on Several Published Manuscripts“ Statement of individual author contributions to figures/tables/chapters included in the manuscripts	289
6.10	Plagiarism check/ Plagiatsprüfung	293
	Affidavit/Eidesstattliche Erklärung	294

Zusammenfassung

Aspergillus fumigatus ist ein opportunistisches fungales Humanpathogen, das ein breites Erkrankungsspektrum von der invasiven Aspergillose (IA) in immunkompromittierten Patienten bis zu einer Reihe von Hypersensitivitätserkrankungen in immunkompetenten Individuen hervorrufen kann. Die Diagnostik für *A. fumigatus*-assoziierte Krankheitsbilder beruht auf mehreren diagnostischen Tests, die auch in ihrer Kombination oft zu späten und unzuverlässigen Diagnosen führen, was wiederum zu einer suboptimalen Patientenversorgung, erhöhter Mortalität und gesteigerten Kosten für das Gesundheitssystem führt. Es besteht daher die unbedingte Notwendigkeit, neue und bessere diagnostische Tests zur Detektion von *A. fumigatus* zu entwickeln. T-Zell-Assays sind vielversprechende, innovative diagnostische Tests, die bereits für andere Infektionskrankheiten in der Routinediagnostik eingesetzt werden. Erste Versuche wurden bereits unternommen, diese Assays auch für *A. fumigatus*-assoziierte Erkrankungen einzusetzen. Die gängigsten, auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)-basierten T-Zell-Assays sind der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *Enzyme-linked Immuno Spot Assay* (ELISPOT) und die Durchflusszytometrie. Das Ziel dieser Dissertation war die Entwicklung eines klinisch einsetzbaren T-Zell-Assays für *A. fumigatus*-assoziierte Erkrankungen.

Die in der Literatur beschriebenen Assays zeigten in unseren Experimenten bei der Anwendung für mykologische Fragestellungen eine hohe Suszeptibilität gegenüber bereits kurzen präanalytischen Lagerzeiten und Kryokonservierung, was einen klinischen Einsatz erschwerte. Wir entwickelten deshalb einen Vollblut-basierten ELISA (VB-ELISA) mit dualer Kostimulation (α -CD28 und α -CD49d), hoher Reproduzierbarkeit und verbesserter Robustheit gegenüber präanalytischen Einflussfaktoren. Der VB-ELISA konnte hohe Differenzen zwischen Typ-1-T-Helferzellen (Th1)-, Th2- und Th17-Zytokinkonzentrationen bei Patienten mit *Aspergillus*-assoziierten Hypersensitivitätskrankheitsbildern und Kontrollpatienten feststellen. Um zu testen, ob dieser Anstieg auf die Erkrankung zurückzuführen ist oder auch bei hoher *Aspergillus*-Umweltexposition vorzufinden ist, wurde der Assay in *Aspergillus*-exponierten gesunden ökologischen Landwirten getestet. In dieser Gruppe fanden wir ebenfalls eine erhöhte

Th1- und Th2-Expansion und -Zytokinsekretion gegenüber gesunden Kontrollspendern, jedoch wurde nur ein geringer Anstieg des Th17-Signalzytokines IL-17 detektiert. Die Detektion von IL-17 im VB-ELISA in Kombination mit anderen Zytokinmarkern ist daher ein vielversprechender Biomarker für die Diagnose von *A. fumigatus*-assoziierten Hypersensitivitätserkrankungen.

Neben diesen Hypersensitivitätserkrankungen haben wir den VB-ELISA auch in immunkompromittierten Patienten nach allogener Stammzelltransplantation (alloSZT), einer Hochrisikogruppe für die IA und die durch das humane Cytomegalovirus (HCMV) ausgelöste Zytomegalie, evaluiert. Während in unserer monozentrischen Pilotstudie aufgrund der geringen Inzidenz keine Evaluation an IA-Patienten erfolgen konnte, wurde mittels VB-ELISA eine hohe Konkordanz der HCMV-spezifischen T-Zell-Antwort mit der HCMV-Serologie sowie eine vergleichbare Leistung zum ELISPOT, dem am häufigsten eingesetzten Assay für diese Fragestellung, festgestellt.

Zusammenfassend haben wir mit dem VB-ELISA einen vielversprechenden und breitflächig im Spektrum *A. fumigatus*-assoziiierter Erkrankungen einsetzbaren T-Zell-Assay entwickelt, der in der Zukunft in großen Studien mit klar definierten Patientenkohorten getestet werden sollte. Auf Grund von Daten aus Folgestudien, die auf dieser Arbeit basieren, ist des Weiteren davon auszugehen, dass der VB-ELISA auf Grund seiner Stärken potenziell in einer Vielzahl von Anwendungsgebieten und Pathogenen (eine Folgestudie mit SARS-CoV-2 wurde vor kurzem veröffentlicht) universell eingesetzt werden kann. Neben der Immundiagnostik für diverse Infektionserkrankungen könnte der Assay außerdem für T-Zell-Antworten auf Vakzinierungen und Immuntherapien, *in vivo* Experimente und *in vitro* Toxizitätstests verwendet werden.

Summary

Aspergillus fumigatus is an opportunistic human pathogen, which is the cause of a wide disease spectrum. The spectrum ranges from invasive Aspergillosis (IA) in immunocompromised patients to diverse hypersensitivity diseases in immunocompetent individuals. Diagnostic assays of *A. fumigatus* have to be combined for efficient detection and still lead to unreliable and late diagnosis, resulting in suboptimal patient care, increased mortality and public health costs. There is, therefore, a great need to develop novel diagnostics for the detection of *A. fumigatus*. T-cell assays are promising, innovative diagnostic assays, which are used in routine diagnostics for certain infectious diseases. First affords have been made to adapt T-cell assays for the diagnosis of *A. fumigatus*-associated diseases. The most common T-cell assays are based on the isolation and stimulation of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and rely on Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), Enzyme-Linked Immuno Spot Assay (ELISPOT) and flow cytometry as their read-out platforms. The aim of this dissertation was to develop a clinically feasible T-cell assay for *A. fumigatus*-associated diseases.

We were able to demonstrate that all of these assays have high susceptibility towards pre-analytic factors like cryopreservation and shortly extended pre-analytic blood storage periods, hampering clinical feasibility. Thus, we developed a whole blood based ELISA (WB-ELISA) with dual co-stimulation (α -CD28 and α -CD49d), which showed high reproducibility, increased robustness towards pre-analytic factors and increased cytokine read-outs. The WB-ELISA was able to quantify large differences of T helper cell 1 (Th1), Th2 and Th17 cytokine concentrations in patients suffering from *Aspergillus*-associated hypersensitivity diseases compared to healthy controls. To analyze, whether these increased cytokine concentrations were the result of the pathology or could also be found in heavily *Aspergillus*-exposed individuals, we examined cytokine concentration in heavily *Aspergillus*-exposed organic farmers. We quantified increased Th1 and Th2 cytokine concentrations, however, we only found a minimal increase in the Th17 signal cytokine IL-17. Interleukin (IL)-17 (most likely in combination with other cytokines) is therefore a promising potential biomarker for the diagnosis of *Aspergillus*-associated hypersensitivity diseases.

In addition to *Aspergillus*-associated hypersensitivity diseases, we tested the feasibility of the WB-ELISA in immunocompromised patients after allogeneic stem cell transplantation (alloSCT). These patients are at high-risk for infections like IA as well as cytomegalovirus (CMV) disease, which is caused by CMV. Although, IA-specific evaluation could not be conducted, due to the low IA-incidence in these patients, the WB-ELISA showed high concordance of HCMV-specific T-cell responses with HCMV-serology as well as comparable performance to the ELISPOT, a commonly used T-cell assay for HCMV, in alloSCT patients.

In conclusion, the successful development of the WB-ELISA has led to a promising and widely applicable T-cell assay for *Aspergillus*-associated diseases. In the future, the WB-ELISA should be evaluated in larger, multi-centric studies in well-defined patient cohorts suffering from *Aspergillus*-associated diseases. Furthermore, the WB-ELISA might be useful for a wide range of areas and pathogens (a follow-up study in COVID-19 patients was recently published). Besides the use in the immune diagnostics of infectious diseases, the WB-ELISA might also be applicable in the quantification of T-cell responses in vaccination- and immune therapy studies, *in-vivo* experiments and *in-vitro* toxicity testing.

1 Einleitung

1.1 Der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* und seine Bedeutung als opportunistisches Humanpathogen

1.1.1 Morphologie und Vorkommen von *A. fumigatus*

Der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* ist ein saprotropher Pilz aus der Gattung *Aspergillus* (Gießkannenschimmel) und gehört zu den Ascomycota (Schlauchpilzen). Weitere *Aspergillus*-Spezies sind unter anderem *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger* und *A. terreus*, jedoch ist *A. fumigatus* der klinisch relevanteste Vertreter der *Aspergilli* [1]. *A. fumigatus* wird zumeist in der Erde und degenerierender Biomasse gefunden, in welcher er eine zentrale Rolle in der Kohlenstoff- und Stickstoffwiederverwertung einnimmt [2]. In der Natur pflanzt sich der Pilz asexuell durch die Bildung von Konidien fort [3, 4]. Ein sexueller Fortpflanzungszyklus und die damit verbundene Produktion von Ascosporen konnte nur unter spezifischen Wachstumsbedingungen im Labor beobachtet werden [5]. Durch seine thermophile Natur wächst der Pilz im Temperaturbereich von 25 bis 55 °C und überlebt auch Extremtemperaturen von bis zu 70 °C [3]. Diese breiten Wachstumsbedingungen verhelfen dem Pilz zu einer globalen Distribution. Die haploiden Konidien werden durch die Luft transportiert und keimen in nährstoffreichen Umgebungen innerhalb von 4 – 6 Std. zu Keimschläuchen aus. Aus diesen Keimschläuchen entwickeln sich Hyphen. Hyphen sind multinukleäre Zellen, die sich verflechten und dadurch eine Struktur, die Myzel genannt wird, bilden [1, 6]. Sie formieren Konidiophoren, die neue Konidien produzieren. Die hydrophoben Konidien verteilen sich aerogen. In Sporenmessungen in der Luft war *A. fumigatus* einer der am häufigsten vorkommenden Pilze [7]. Jeder Mensch atmet am Tag 100 – 1000 Konidien ein. Die Konidien haben einen Durchmesser von 2 – 3 µm und gelangen daher tief in die humane Lunge bis in die Alveolen [3].

1.2 *A. fumigatus*-assoziierte Erkrankungen

Eine balancierte physiologische *A. fumigatus*-Immunantwort verhindert das Wachstum des Pilzes in der Lunge. Eine Über- oder Unterreaktion des Immunsystems führt zu diversen *A. fumigatus*-assoziierten Erkrankungen. Eine Überreaktion des Immunsystems gegen *A. fumigatus* kann zu Hypersensitivitätspathologien führen. Im Gegensatz dazu führt eine Unterreaktion in immunkompromittierten Patienten zur invasiven Aspergillose (IA) (**Abbildung 1**) [8].

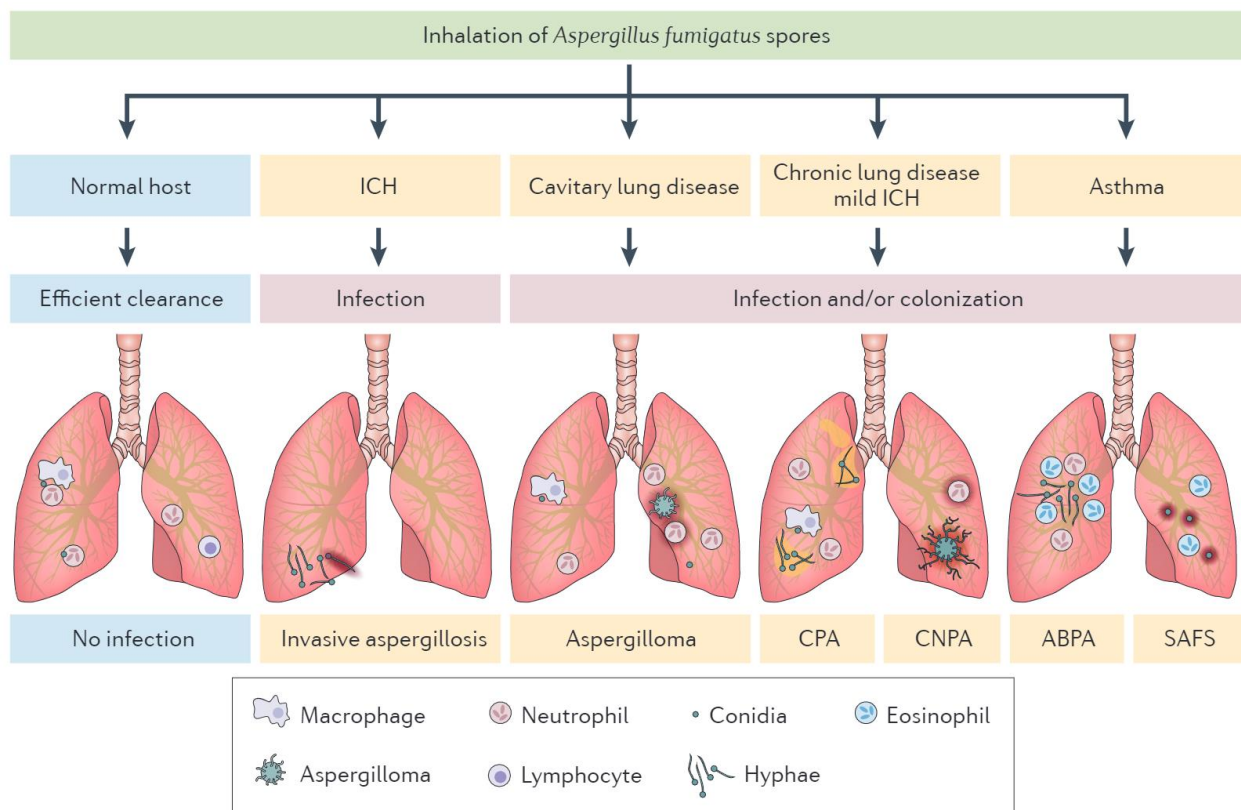


Abbildung 1: *A. fumigatus*-assoziierte Pathologien. Die Inhalation von *A. fumigatus*-Konidien kann unterschiedliche Erkrankungen auslösen. Bei Menschen mit physiologischer Immunantwort löst der Pilz weder eine Infektion noch eine Hypersensibilitätskrankheit aus. Bei immunkompromittierten Patienten (ICH) kann der Pilz seinen Wirt infizieren, was zu einer invasiven Aspergillose führen kann. Eine milde Kompromittierung des Immunsystems (mild ICH) in chronischen respiratorischen Pathologien, kavitären Lungenerkrankungen oder Asthma können *A. fumigatus*-assoziierte Erkrankungen auslösen. Diese *A. fumigatus*-assoziierten Erkrankungen beinhalten das Aspergillom, die Chronische pulmonale Aspergillose (CPA), die Chronische nekrotisierende pulmonale Aspergillose (CNPA), die Allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) und das Schwere Asthma mit Pilzsensibilisierung (SAFS). Die Abbildung wurde aus dem *Review*-Artikel von van de Veerdonk und Kollegen übernommen [1].

1.2.1 Die invasive Aspergillose (IA)

Ein immunkompromittierter Wirt ist die Hauptvoraussetzung für die Entwicklung einer IA. Die Immunkompromittierung kann durch die Verabreichung von Immunsuppressiva oder durch ein anderweitig eingeschränktes Immunsystem, wie eine Neutropenie, entstehen [8]. Bei der IA keimen *Aspergillus*-Konidien in der Lunge aus und wachsen invasiv ins Lungenparenchym und in die pulmonalen Blutgefäße. Dieses Pilzwachstum führt zu einer ischämischen Nekrose des Lungengewebes. In fortgeschrittenen Krankheitsstadien kann der Pilz nach der Angioinvasion disseminieren und sich in anderen Organen wie dem zentralen Nervensystem und der Leber verbreiten [8]. Die IA ist die häufigste Pilzinfektion bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation (alloSZT) und bei Patienten mit soliden Organtransplantationen [8]. Mittlerweile wurde die IA aber auch in anderen Patientengruppen beschrieben. Schwere Influenza oder COVID-19-Verläufe können z. B. eine IA zur Folge haben [9-11]. Die IA entwickelt sich zu einem zunehmenden Problem für das Gesundheitssystem. In den Jahren von 2000 - 2013 erhöhte sich die IA-Prävalenz beispielweise in den USA um 3 % pro Jahr [12].

Diagnostik für die IA

Die Diagnose der IA wird aus einer Kombination von klinischen, radiologischen und mikrobiologischen Daten gestellt. Bei Hochrisikopatienten weisen Fieber unbekannter Herkunft, andere Symptome einer Infektion der unteren Atemwege und gleichbleibende Symptomatik nach Verabreichung von Breitbandantibiotika auf eine Pilzinfektion hin [13]. Als radiologisches Diagnostikum werden unterschiedliche Formen der Thoraxbildgebung verwendet. Besonders in der frühen Diagnostik der IA ist die Thoraxbildgebung allerdings nicht sensitiv und spezifisch genug. Selbst eine Woche vor dem Tod sind 10 % der IA-Patienten in der Thoraxbildgebung negativ [13-15]. Außerdem bleiben bei nicht-neutropenischen Patienten die klassischen radiologischen Manifestationen oft aus [16, 17]. Deswegen muss die Radiologie mit anderen diagnostischen Tests kombiniert werden [13-15]. Der mikroskopische Beweis von ins Lungengewebe gewachsenem *A. fumigatus* in Proben einer Biopsie wird als gesicherter Nachweis einer IA gewertet, kann jedoch nur eine Sensitivität von 50 % erreichen und des Weiteren aufgrund der Morbidität der Patienten oft nicht durchgeführt werden (z. B. bei der

Thrombozytopenie) [18]. Auch Kulturen sind durch ihre Sensitivität von unter 30 % in der IA Diagnostik stark limitiert [8]. Der Galactomannan (GM)-*Aspergillus*-Antigen-Test detektiert den *A. fumigatus*-Zellwandbestandteil GM im *bronchoalveolar lavage* (BAL) oder Serum der Patienten und ist einer der Pfeiler der IA-Diagnostik. Der GM-Test zeigt bei bestimmten Patientengruppen eine Sensitivität von 67 – 100 % und Spezifität von 86 – 99 %. Bei anderen Patientengruppen, wie pädiatrischen oder nicht neutropenischen Patienten sowie Patienten mit antimykologischer Prophylaxe, sinkt die Sensitivität jedoch bis auf 30 % [19-21]. Ähnlich wie beim GM-Test kann auch nach dem *A. fumigatus*-Zellwandbestandteil (1-3)-b-D-Glucan gesucht werden. Obwohl der Test in Studien eine Sensitivität von 67- 100 % und eine Spezifität von 84 – 100 % gezeigt hat [22, 23], spielt dieser diagnostische Test in der IA-Diagnostik nur eine untergeordnete Rolle [8, 13]. Außerdem kann *Aspergillus*-DNA durch die *Aspergillus*-PCR detektiert werden. Der *Aspergillus*-PCR-Test nach FPCRI-Kriterien zeigt eine gepoolte Sensitivität von 79 % im Vollblut (VB) und 93 % im Plasma sowie eine Spezifität von 79 % im VB und 69 % im Plasma. Trotz großer Anstrengungen bestehen jedoch immer noch Probleme in der Standardisierbarkeit der *Aspergillus*-PCR, die unter anderem auf die Vielzahl der kommerziellen und *in-house-Assays* zurückzuführen sind [24].

Trotz des breiten Spektrums an diagnostischen Tests ist eine frühe Diagnose der IA daher noch immer eine große Herausforderung. In der Routine kann kein diagnostischer Test eine verlässliche Diagnose stellen und die Verwendung mehrerer diagnostischer Tests ist notwendig [24-26]. Für Forschungszwecke wird daher die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins einer IA nach den EORTC-Kriterien eingeschätzt. Hierbei werden mögliche, wahrscheinliche oder gesicherte IAs unterschieden [27]. Eine frühe Diagnose der IA ist mit stark gesenkten Mortalitätsraten verbunden und notwendig, um die hohen Mortalitätsraten von 20 - 59 % (in Abhängigkeit von der zugrunde liegenden Pathologie) zu vermindern [28-33]. Daher gibt es einen enormen Bedarf an besseren diagnostischen Tests für die IA.

1.2.2 Die Chronische pulmonale Aspergillose (CPA)

Die CPA ist eine chronische, nicht-invasive Form der Aspergillose und betrifft allein in Europa über 240.000 Menschen [34]. Prädisponierende Grunderkrankungen für die CPA sind unter anderem Tuberkulose (weltweite geschätzte CPA Prävalenz von 1,7 Millionen), Allergische Bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) (weltweite geschätzte CPA Prävalenz von 411.000), Sarkoidose (weltweite geschätzte CPA-Prävalenz von 411.000) chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Pneumothoraxkarzinom und therapiertes Lungenkarzinom [35-39]. Die prädisponierenden Pathologien inhibieren die physiologische Immunität gegen *A. fumigatus*, indem sie unter anderem Kavitäten schaffen und die mukoziliären Verteidigungsmechanismen schwächen [8].

Im Gegensatz zur IA liegt bei CPA-Patienten nur eine leichte oder keine Immunsuppression vor. Die CPA ist in verschiedene Subpathologien unterteilt: Aspergillom, *subacute invasive aspergillosis* (SAIA), *chronic cavitary pulmonary aspergillosis* (CCPA) und *chronic fibrotic pulmonary aspergillosis* (CFPA) [34, 40, 41].

Ein **Aspergillom** ist eine fungale Masse, die sich in den von den prädisponierenden Pathologien geschaffenen Kavitäten in der Lunge bildet. *A. fumigatus* kolonialisiert hierbei zuerst eine Kavität, wonach er in eine ballförmige Struktur wächst. Diese Struktur besteht fast ausschließlich aus fungalen Hyphen und extrazellulärer Matrix [34, 42]. Neuzig Prozent aller Aspergillome geht in Entwicklungsländern eine Tuberkuloseinfektion voraus. Milde bis, in seltenen Fällen, lebensbedrohliche Hämoptysen sind eines der häufigsten Symptome des Aspergilloms. Daher sollte das Aspergillom nach Möglichkeit operativ entfernt werden [8, 34, 42].

CCPA ist die häufigste Form der CPA. Bei der CCPA sind eine oder mehrere Lungenkavitäten vorhanden, von denen manche ein Aspergillom enthalten. Pulmonale oder systemische Symptome und eine Krankheitsprogression über 3 Monate stellen das charakteristische klinische Bild dar [34]. Eine unbehandelte CCPA kann sich zu einer **CFPA** entwickeln. Der Leitbefund der CFPA ist die Fibrose eines oder mehrerer Lungenlappen, die zu fibrotischer Zerstörung des Lungengewebes führt. Ein starker Verlust der Lungenfunktion ist die Folge [34]. **SSIA** wird bei

leicht immunsupprimierten Patienten beobachtet und ähnelt der CCPA. Die zwei Hauptunterschiede zur CCPA sind ein invasives Hyphenwachstum und eine beschleunigte Progression der Erkrankung [34].

Diagnostik für die CPA

Die Diagnose der CPA beruht auf mehreren Säulen [34]. Der wichtigste Bestandteil ist die Thoraxbildgebung. Der Befund der Bildgebung wird mit mikrobiologischen und immunologischen diagnostischen Tests kombiniert. Die immunologische Diagnostik umfasst die Detektion von *Aspergillus*-spezifischen Immunglobulin(Ig)Gs, *Aspergillus*-Antigenen und Präzipitinen. Zusätzlich werden die Grunderkrankung, die Fortschrittsgeschwindigkeit der CPA und die Dauer der Anwesenheit der Symptome in Betracht gezogen (1-3 Monate für SSIA; über 3 Monate für die restlichen CPAs) [34].

Mikrobiologisch wird Material einer Lungenbiopsie auf *A. fumigatus*-Hyphen untersucht und deren invasives Wachstum geprüft. Eine Invasion lässt auf eine SSIA schließen. Eine positive Kultur kann ebenfalls *A. fumigatus* nachweisen [34]. Positive Kulturen werden bei 56 – 81 % der CPA-Patienten gefunden [41, 43, 44]. Der GM-Antigen-Test zeigt in der BAL eine Sensitivität von 77– 86 % und eine Spezifität von ca. 77 %. In Serumproben wird eine Sensitivität von 23– 67 % und eine Spezifität von 64 % gefunden [45-47]. Daher wird der GM-Test aus der BAL, nicht jedoch aus dem Serum empfohlen [34]. Antikörpertests sind die wichtigsten diagnostischen Assays für die CPA [48]. Eine Aussage über deren Effizienz ist auf Grund der großen Anzahl an verschiedenen kommerziellen und *in-house*-Assays und unzureichenden vergleichenden Studien jedoch nicht möglich [34]. Es bestehen aber große Unterschiede in Sensitivität und Spezifität [34]. Dementsprechend wurden Antikörpertests nur unzureichend standardisiert und es fehlen Studien, die Antikörperantworten mit der Art und der Schwere der CPA in Verbindung bringen [8].

CPA-Patienten haben ohne Therapie eine hohe 5-Jahres-Mortalitätsrate von 75 – 80 %. Die Therapie kann jedoch nur durch eine frühzeitige Diagnosestellung eingeleitet werden. Die Diagnosestellung ist für die Kliniker anhand der aktuellen diagnostischen Möglichkeiten eine

große Herausforderung [34]. Neue Diagnostika oder Biomarker und die Weiterentwicklung bestehender diagnostischer Methoden sind daher unabdingbar.

1.2.3 Allergische Aspergillose

Die allergischen Aspergillosen werden von einer Hypersensitivitätsreaktion auf *Aspergillus*-Antigene ausgelöst. Sie können in die Kategorien ABPA, *Aspergillus*-induziertes Asthma (AIA) und allergische *Aspergillus*-Sinusitis (AAS) unterteilt werden [49].

1.2.3.1 Die allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA)

Die ABPA kommt hauptsächlich bei Patienten mit Asthma oder zystischer Fibrose (CF) vor [49]. Ein bis fünfzehn Prozent aller CF-Patienten leiden an einer ABPA. Bei Asthmatikern wird die ABPA-Prävalenz auf 2,5 % geschätzt. Dementsprechend sollten 4,8 Millionen Asthma-Patienten weltweit an ABPA erkrankt sein [36, 50]. Diese allergische Antwort wird von Typ-2-T-Helferzellen (Th) und IgE mediiert und führt zu einer starken Entzündungsreaktion in der Lunge [49]. Bei einigen Patienten wird jedoch auch eine IgG-mediierte Antwort gefunden. Die Symptome umfassen schlecht kontrolliertes Asthma, Atemnot, Erschöpfung, Gewichtsverlust, Hämoptysen, leichtes Fieber und Husten mit Auswurf. Die Erkrankung führt in ihrer finalen Form zu einer irreversiblen Fibrose des Lungengewebes [49]. Eine ABPA kann sich ebenfalls zu einer CPA weiterentwickeln [51]. Die frühe Diagnose der ABPA ist unabdingbar für den Patienten, da die starke Entzündung ohne Therapie zu Bronchitis, Lungenfibrose, Rechtsherzinsuffizienz und einem Verlust der Lungenfunktion führen kann [51, 52].

Diagnostik für die ABPA

Die Standardisierung der diagnostischen Kriterien gestaltet sich schwierig. Einer der bekanntesten Versuche die ABPA-Diagnostik zu standardisieren sind die ISHAM-Kriterien [51]. Wie bei der IA und CPA muss die Diagnose auf Basis mehrerer Kriterien gestellt werden. Als erstes Kriterium wird die Grunderkrankung des Patienten betrachtet. Wie bereits erwähnt, sind Asthma und CF die beiden häufigsten prädisponierenden Krankheitsbilder, die zu einer ABPA führen.

Die Radiologie wird in der Diagnostik von ABPA genutzt. Jedoch sind die Charakteristika, die zur Diagnose herangezogen werden, nur bei wenigen Patienten mittels Radiologie sichtbar. Zum Beispiel wird eine zentrale Bronchiektasie, ein Kennzeichen der ABPA, nur bei 37 % der ABPA Patienten gefunden [53].

Der *Aspergillus*-Hauttest (Prick-Test) dient dem Nachweis einer IgE-Sensibilisierung und ist einer der wichtigsten diagnostischen Tests für die ABPA. Die Sensitivität ist mit 90 % hoch, jedoch ist die Spezifität stark limitiert, da auch 40 % der Asthmapatienten ohne ABPA im *Aspergillus*-Hauttest positiv sind [54, 55]. Ebenfalls wichtig ist die Bestimmung des gesamten und *Aspergillus*-spezifischen IgE im Serum. Die Aussagekraft des Tests unterscheidet sich bei CF-Patienten und Asthmatikern. Die Bestimmung des Gesamt-IgE hat bei Asthmatikern eine Sensitivität von 88 % und eine Spezifität von 67 %, während das *Aspergillus*-spezifische IgE eine Sensitivität von 96 % und eine Spezifität von 88 % zeigt [51]. Auch die Detektion von *Aspergillus*-IgG wird bei klinischem ABPA-Verdacht durchgeführt. *Aspergillus*-IgG ist nicht spezifisch für ABPA und hauptsächlich ein Marker der CPA (siehe **Kapitel 1.2.2**). Es kann jedoch den Übergang zu einer CPA signalisieren [41, 56]. Ein weiteres Diagnosekriterium ist eine Eosinophilie. Diese wird aufgrund einer häufig isoliert pulmonalen Ausprägung allerdings nur bei 40 % der ABPA-Patienten im Blut gefunden und ist zudem nicht spezifisch für die ABPA. [51]. Ein zusätzlicher diagnostischer Test ist der kulturelle Nachweis von *Aspergillus* im Sputum. Dieser ist bei zu 39 – 60 % der Patienten positiv und die Kontrolle von sequenziellen Proben in der Kultur erhöht die Chance auf die Detektion von ABPA [57, 58].

In der Gesamtschau gestaltet sich die Diagnose der ABPA schwierig und es vergehen oft Jahre zwischen der initialen ABPA-Symptomatik und der Diagnosestellung [59]. Genau wie bei der IA und der CPA gibt es keinen Test, der allein über eine hinreichende Sensitivität und Spezifität für die ABPA verfügt. Daher sind auch in der ABPA-Diagnostik neue Tests notwendig.

1.2.3.2 Allergische umweltassoziierte *Aspergillus*-Krankheitsbilder

Die allergischen mit *Aspergillus*-assoziierten Krankheitsbilder, die in der Umweltmedizin Relevanz haben, sind Hypersensitivitäts-Pneumonitis mit ihrer Unterform der exogen-

allergischen Alveolitis, bronchozentrische Granulomatose, eosinophile Pneumonie, schweres Asthma mit fungaler Sensibilisierung (SAFS), allergische mykotische Rhinitis (AFRS) und ABPA (siehe **Kapitel 1.2.3.1**, hier jedoch auch ohne Komorbidität zu finden) [60]. Hierbei ist vor allem die berufliche Schimmelpilzexposition, wie sie z. B. in landwirtschaftlichen Betrieben [61, 62] und in der Holzverarbeitenden Industrie [60, 63, 64] vorzufinden ist, ein wichtiger Risikofaktor. Drei bis zehn Prozent der Bevölkerung zeigen eine Pilzsensitivierung [65, 66]. Während bei vielen Individuen eine Sensitivierung asymptomatisch ist, kann bei atopischen Patienten eine große Bandbreite an Symptomen beobachtet werden. Diese reichen von milden Symptomen wie Rhinorrhoe, Niesreiz (Sternutatio) und Husten (Tussis) bis zum Vollbild der ABPA oder Asthma bronchiale. Die schwersten Verläufe können zum Tod des Patienten führen. Neben der atopischen Prädisposition ist die Schwere der Symptomatik auch von der Höhe der Pilzexposition abhängig [60].

Diagnostik für das Bio- und Bioeffektmonitoring umweltassoziierter *Aspergillus*-Exposition

Im Allgemeinen findet die Diagnose von umweltassozierten *Aspergillus*-Erkrankungen durch die Immunglobulinbestimmung (primär IgE) statt [60]. Jedoch werden für manche Krankheitsbilder ggf. auch weitere krankheitsspezifische diagnostische Tests eingesetzt. Die exogene allergische Alveolitis ist z. B. nicht primär IgE-vermittelt und wird via IgG-Nachweis, Thoraxbildgebung (für Spätstadien), Bronchoskopie und für gutachterliche Fragestellungen durch einen Provokations- bzw. Karentest diagnostiziert [67]. Umweltmedizinisch gibt es lediglich zwei Testsysteme, die zur Bestimmung der Intensität der Schimmelpilzexposition angewendet werden. Zum einen ist das die Messung der sich in der Luft befindlichen Sporenkonzentration und zum anderen die oben genannte Immunglobulinbestimmung (primär IgE) im Serum. Beide Techniken haben Schwächen. Hinsichtlich der Sporenkonzentrationsmessungen gibt es keine etablierten Grenzwerte für tolerable Sporenkonzentrationen in der Luft. Außerdem geben derartige Messungen keine Informationen über die Langzeitexposition und die immunologischen Reaktionen der betroffenen Personen. Die Immunglobulinbestimmung kann weder Auskunft über Dosis, Länge noch den zeitlichen Rahmen der Exposition geben [68]. Diese Limitationen illustrieren die Notwendigkeit, neue Biomarker für Schimmelpilzexposition zu evaluieren.

1.3 Die Immunantwort auf *A. fumigatus*

1.3.1 Physiologische innate Immunreaktion gegen *A. fumigatus*

Die erste Verteidigungslinie gegen *A. fumigatus*-Konidien ist von physischer Natur. Viele Konidien werden bereits durch die Nasenmuscheln und durch die Verästelung des bronchialen Systems und dem dadurch entstehenden turbulenten Luftstrom daran gehindert, tiefer in die Lunge einzudringen. Durch den turbulenten Luftstrom werden die Konidien im bronchialen Mukus gefangen und durch Zilien aus der Lunge transportiert. Die Konidien, die tiefer in die Lunge gelangen, werden durch das zelluläre Immunsystem zerstört [69].

Konidien, denen es gelingt, bis in die Alveolen vorzudringen, kommen als erstes mit Alveolaren Epithelzellen (EZs) und Alveolarmakrophagen (AM) in Kontakt. **EZs** können Konidien phagozytieren und in aziden Phagolysosomen zersetzen. Nur weniger als 3 % der durch die EZs phagozytierten Konidien sind in der Lage, innerhalb der EZs auszukeimen [70]. Wenn Konidien der Phagozytose der EZs entkommen oder auf den EZs auskeimen, werden Signalkaskaden ausgelöst, die eine Entzündungsreaktion einleiten. Hierbei werden antimikrobielle Peptide und *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) freigesetzt und Neutrophile via *C-X-C motif ligand* (CXCL)1 sowie CXCL2 und Interferone (IFNe) der Typen I und III rekrutiert [8, 71-74]. Konidien, die den Verteidigungsmechanismen entkommen und zu Hyphen auskeimen, lösen in bronchialen EZs die Sekretion von Interleukin (IL)-8 aus [75].

AM erkennen Konidien mit verschiedenen Rezeptoren wie DC-SIGN [76], Dectin-1 [77] und löslichen *pattern recognition receptors* (PRRs) wie Pentraxin-3 (PTX-3) [78]. Die Konidien werden phagozytiert und innerhalb von 24 Stunden in aziden Phagolysosomen vernichtet [1].

Die reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-Produktion durch Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase spielt ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung von *A. fumigatus* durch **Neutrophile**. Die Vernichtung von Hyphen ist abhängig von der NADPH-Oxidase [79]. Durch die Induktion der NADPH-Oxidase wird die *neutrophil extracellular trap*

(NET)ose eingeleitet. Bei der NETose werden von den Neutrophilen NETs gebildet, die aus Desoxyribonukleinsäure (DNA) bestehen und antimikrobielle Peptide beinhalten. Diese NETs werden gegen Hyphen eingesetzt, die bereits zu groß sind, um phagozytiert zu werden. Obwohl NETose eine wichtige Rolle in der innate Immunantwort gegen *A. fumigatus* spielt, wurde festgestellt, dass NETs *A. fumigatus* nicht direkt töten. Stattdessen schädigen die durch die Neutrophilen sezernierten ROS die Hyphen des Pilzes [1]. Andere antimykotische Mechanismen der Neutrophile sind ROS-unabhängig. Hierzu zählt die Verteidigung gegen Konidien durch Lactoferrin-medierte Eisenentzug, der dem Pilz die notwendigen Wachstumsnährstoffe vorenthält [79, 80]. Weitere Mechanismen sind die Sekretion von antimikrobiellen Peptiden, Proteasen [81] sowie PTX-3 [82]. Generell sind Neutrophile die wichtigsten Effektorzellen im Kampf gegen eine *Aspergillus*-Infektion und ihre Rekrutierung zum Infektionsort ist daher von höchster Wichtigkeit. Die frühe Neutrophilenrekrutierung findet via MyD88 statt, das durch die Sekretion von Type-I-IFN von Lungen EZs aktiviert wird. Die späte Rekrutierung ist von CARD-9 abhängig, welches über CXC-Signalkaskaden aktiviert wird [8].

Eosinophile zeigen ebenfalls antifungale Aktivität, indem sie den Pilz direkt angreifen. Durch die Regulierung anderer Immunzellen via der IL-23/IL-17 Achse sind sie auch indirekt an der antifungalen Antwort beteiligt [83, 84].

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) erkennen *A. fumigatus*-Keimschläuche und -Hyphen mit dem PRR *Cluster of Differentiation* (CD)56 [85-87]. Nach ihrer Aktivierung sezernieren sie die Moleküle Granzym und Perforin, die den mykotischen Strukturen direkt schaden [86]. Zusätzlich schütten sie Chemokine und Zytokine aus, die zur Rekrutierung, Aktivierung und Regulierung sekundärer Immunzellen wie dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen beitragen [88, 89]. Während der Neutropenie sind NK-Zellen essenziell, um ein invasives Pilzwachstum zu verhindern. In der neutropenischen Phase bei alloSZT-Patienten zeigen Patienten mit niedrigen NK-Zell-Zahlen oder einer späten NK-Zell-Rekonstitution ein erhöhtes Risiko für eine IA [90].

Monozyten, von Monozyten stammende dendritische Zellen (**mo-DCs**) und plasmacytoide dendritische Zellen (**pDCs**) sind ebenfalls ein wichtiger Bestandteil für die Immunantwort gegen *A. fumigatus*. pDCs erkennen *A. fumigatus* Hyphen durch Dectin-2. Nach dem Kontakt sezernieren

sie IFN- γ und Tumornekrosefaktor (TNF)- α , bilden NET-ähnliche DC *extracellular traps* (pETs) und zeigen antimykotische Aktivität [91]. Inflammatorische Monozyten differenzieren nach dem Kontakt mit *Aspergillus* zu mo-DCs. Mo-DCs können den Pilz phagozytieren und abtöten. Indirekt können sie durch die Erhöhung der Aktivität von Neutrophilen für eine gesteigerte Elimination von Konidien sorgen. CCR2⁺ inflammatorische Monozyten fördern durch Typ-I und -III-IFNs die antifungale ROS-Aktivität von Neutrophilen [92, 93]. CD14⁺CD16⁺ Monozyten aktivieren die Leucin-Aminopeptidase (LAP) und begrenzen dadurch das Pilzwachstum [94]. Sowohl Monozyten als auch mo-DCs migrieren zu den Lymphknoten, in denen sie *Aspergillus*-Antigene an Zellen des adaptiven Immunsystems präsentieren und dieses aktivieren [95]. Sie stellen so eine wichtige Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem dar.

Der innate Teil des **humoralen** Immunsystems ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der *Aspergillus*-Immunreaktion. Neben dem Mannan-bindenden Protein (MBP), den *surfactant proteins* (SP)-1 und SP-2 steht vor allem der lösliche PRR PTX-3 im Fokus der Forschung [8]. PTX-3 Polymorphismen führen zu einer erhöhten Suszeptibilität für IA und CPA [96-100]. EZs und Makrophagen sezernieren PTX-3, welches *Aspergillus*-Konidien opsoniert und dadurch deren Phagozytose fördert [8, 78, 101].

1.3.2 Die adaptive Immunantwort: Ein Exkurs in die Welt der T-Zell-Antwort und -Proliferation

Das adaptive Immunsystem ist in der Lage, Pathogen-spezifische Immunreaktionen zu generieren. Es bildet langlebige Gedächtniszellen, um auf eine erneute Infektion mit demselben Pathogen durch rapide Proliferation schnell reagieren zu können [102]. **B-Zellen** sind adaptive Immunzellen, die durch ein enormes Repertoire an diversen IGs auf der Zelloberfläche artfremde Stoffe erkennen können und die durch diese Stoffe aktiviert werden. Stoffe, die an spezifische Lymphozytenrezeptoren binden, werden Antigene genannt. B-Zellen sind für die humorale Immunantwort verantwortlich [103]. **T-Zellen** besitzen hochspezifische T-Zell-Rezeptoren (TCRs), die ebenfalls Antigene (zumeist Proteine) erkennen und durch diese Antigene aktiviert

werden [104]. Diese Antigene können der Umwelt entstammen oder in Form von z. B. Tumoren im eigenen Körper entstehen. Bei Umweltantigenen müssen T-Zellen Pathogenantigene von ungefährlichen Stoffen unterscheiden und die Stärke sowie die Art der Immunreaktion regulieren. Auch im Körper dürfen nur entfremdete Antigene erkannt werden, um die Entstehung von Autoimmunkrankheiten zu verhindern. Die Eigenschaft der T-Zellen, Autoantigene und ungefährliche Antigene zu ignorieren, wird als Toleranz bezeichnet [104].

Die Vorgängerzellen der T-Zellen werden im Knochenmark gebildet und migrieren zum Thymus, in dem sie selektiert werden und maturieren. Es entstehen drei T-Zell-Hauptgruppen: 1. CD4⁺ Th-Zellen, 2. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen und 3. regulatorische T-Zellen (Tregs). Nach dem Export aus dem Thymus patrouillieren ruhende „naive“ T-Zellen durch die sekundären lymphatischen Organe (Milz und Lymphknoten), aber auch durch unterschiedliche Gewebe und das Blut. Die naiven T-Zellen lösen im Ruhezustand keine Immunreaktion aus, sondern müssen erst aktiviert werden [102, 104].

Zur T-Zell-Aktivierung werden Antigene von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) für T-Zellen präsentiert. Der Prototyp einer APC ist die DC. DCs werden aktiviert und migrieren in die sekundären lymphatischen Organe. Sie verarbeiten Proteine und präsentieren sie auf Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHCs). Es gibt zwei MHC-Typen: MHC-Typ-I und MHC-Typ-II. MHC-Typ-I präsentiert intrazelluläre Antigene an CD8⁺ T-Zellen und MHC-Typ-II präsentiert extrazelluläre Proteine an CD4⁺ T-Zellen. In den sekundären lymphatischen Organen binden antigenspezifische T-Zellen den MHC-Antigen-Komplex der DCs [105].

Der TCR auf der T-Zelle ist mit CD3 assoziiert sowie, je nach T-Zell-Typ, mit CD4 oder CD8 und verstärkt so die Bindung mit dem MHC-Antigen-Komplex der DC. Die Bindung des TCRs an den MHC-Antigen-Komplex ist das erste Signal für die T-Zell-Aktivierung. Für die T-Zell-Aktivierung werden jedoch zusätzliche Signale benötigt. Liegt nur das erste Signal vor, geht die T-Zelle in einen hyporesponsiven Status (Anergie) über [102]. Hierdurch sollen autoreaktive T-Zellen, die den Selektionsprozess im Thymus fälschlicherweise überlebt haben, an der Aktivierung gehindert werden [105].

Als zweites Signal dienen kostimulatorische Faktoren. Die am besten definierten kostimulatorischen Faktoren sind Zell-gebundene Rezeptoren auf APCs [106]. APCs werden durch verschiedene Zytokine, die während einer Entzündungsreaktion sezerniert werden, und/oder durch PRR-Stimulation aktiviert und exprimieren daraufhin kostimulatorische Faktoren [107]. Der T-Zell-Rezeptor CD28 ist der primäre kostimulatorische Faktor und bindet an die APC-Rezeptoren CD80 und CD86. Zwei weitere Beispiele für kostimulatorische Faktoren sind CD40 und CD49d [106, 108]. Neben den stimulatorischen gibt es auch inhibitorische kostimulatorische Faktoren wie *Cytotoxic T-lymphocyte Antigen (CTLA)-4* [106]. Das dritte Signal ist die T-Zell-Stimulation durch Zytokine. Die vorhandenen Zytokine entscheiden hierbei über die Art der Differenzierung und die Expansion der T-Zellen. Die antigenspezifische T-Zelle wird aktiviert, wenn diese drei Signale in der richtigen Reihenfolge von der Zelle detektiert werden. Nach der Aktivierung differenzieren und expandieren die T-Zellen und migrieren zum Infektionsort [109].

T-Zellen, die noch nicht mit ihrem spezifischen Antigen in Kontakt gekommen sind, werden naive T-Zellen genannt und sind durch die Expression von CD45RA und CCR7 gekennzeichnet. In der primären Reaktion entstehen nach der initialen Antigenstimulation durch die klonale Expansion eine Vielzahl von CD45⁺CCR7⁻ Effektor-T-Zellen (Teff), die mit ihren Effektorfunktionen den Körper verteidigen. Diese Reaktion erreicht ihren Höhepunkt nach 7 – 15 Tagen. Nach dem Höhepunkt der Reaktion sterben 90 – 95 % der expandierten Zellen ab [102].

Es hinterbleiben in einer vereinfachten dichotomischen Darstellung eine kleine Anzahl an CD45RA⁻CCR7⁻ Effektor (Tem)- und CD45RA⁻CCR7⁺ zentralen (Tcm) Gedächtniszellen. Diese Zellen werden bei erneuter Stimulation leichter aktiviert, haben ein erhöhtes Expansionspotenzial und können ihre Effektorfunktionen schneller ausführen. Zusätzlich patrouillieren sie in peripheren Geweben, in denen naive T-Zellen nur selten angetroffen werden, um auf eine erneute Stimulation schneller reagieren zu können. Tem-Zellen zeigen nach Reaktivierung schnelle Effektorfunktionen, besitzen jedoch nur geringes Expansionspotenzial. Im Gegensatz dazu sind die Effektorfunktionen von Tcm-Zellen gering, aber ihr Expansionspotenzial ist hoch. Tcm-Zellen sorgen dadurch für eine erneute, hocheffiziente klonale Expansion, während die Tem-Zellen die

Infektion frühzeitig unter Kontrolle halten. Gedächtniszellen haben eine Halbwertszeit von ungefähr 8 – 15 Jahren und ermöglichen dem Körper so einen langanhaltenden Schutz vor vielen Pathogenen [102].

1.3.3 CD4⁺ T-Zellen

Naive CD4⁺ T-Zellen werden in sekundären lymphatischen Organen durch den Kontakt mit APCs aktiviert und differenzieren nachfolgend in Effektor- und Gedächtniszellen verschiedener Th-Gruppen. Sie töten die Mikroben nicht direkt, sondern orchestrieren das angeborene und adaptive Immunsystem. Hierdurch erhöhen sie die Phagozytoseeffizienz, rekrutieren und aktivieren Leukozyten und sind an der Entstehung einer effektiven humoralen Immunantwort beteiligt. Durch die unterschiedlichen Funktionen der Th-Untergruppen kann das adaptive Immunsystem spezifisch auf diverse mikrobielle Infektionen reagieren. In diesem Kapitel werden die drei Hauptuntergruppen Typ 1 Helfer T-Zelle (Th1), Th2 und Th17 im Bezug auf ihre *A. fumigatus*-Immunantwort besprochen. Die Th-Gruppen werden über Signalzytokine, Transkriptionsfaktoren, die Expression von Chemokin- und Chemokinrezeptoren und die daraus resultierenden Funktionen definiert. Die Unterteilung in die Untergruppen ist nicht absolut. Es gibt z. B. T-Zellen, die typische Zytokine für verschiedenen Th-Untergruppen sezernieren [110].

Die Differenzierung der Untergruppen findet in den lymphatischen Organen statt. Aktivierte antigenspezifische T-Zellen werden durch Zytokine in eine bestimmte Th-Differenzierungsrichtung geleitet. Diese werden von APCs und anderen Immunzellen, die sich in den lymphatischen Organen befinden, sezerniert [110]. Die wichtigsten Charakteristika der Th1-, Th2- und Th17-Zellen sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.







Effektor-T-Zellen	Transkriptionsfaktor/en	Signalzytokin	Weitere Zytokine	Chemokinrezeptore/n	Induzierende Zytokine	Prinzipielle Zielzelle	Allgemeine Abwehrfunktion	Allgemeine Rolle in Krankheitsbildern	Rolle in der <i>A. fumigatus</i> Immunantwort
 Th1	T-bet STAT1 STAT4	IFN-γ	TNF IL-10	CXCR3 CCR5 E-Selektin ^{hoch} P-Selektin ^{hoch}	IFN- γ IL-12 IL-18 Typ-1-Interferone	Makrophagen 	Intrazelluläre Pathogene	Autoimmunität Chronische Entzündungen	Pilzelimination
 Th2	GATA-3 STAT6	IL-4	IL-5 IL-13	CCR3 CCR4 CCR8	IL-4 IL-25 IL-33 TSLP	Eosinophile 	Helmintheninfektionen	Allergie	Pilzpersistenz Entzündung
 Th17	RORγt STAT3	IL-17	IL-21 IL-22	CCR6	IL-1 (frühe Differenzierung) IL-6 (frühe Differenzierung) IL-23 (Proliferation und Beibehaltung der Th17 Reaktion) TGF- β (nur in Kombination mit anderen Signalen wie IL-1 und IL-6)	Neutrophile 	Extrazelluläre Bakterien Pilze	Autoimmunität Entzündungen	Akute IL-17 Aktivierung: Pilzelimination Chronische IL-17 Aktivierung: Pilzpersistenz Entzündung

Tabelle 1: T Helferzellen. Die Tabelle beschreibt die wichtigsten Charakteristika der T-Helferzelltypen 1, 2 und 17. Adaptiert und erweitert aus [111].

1.3.4 T-Zell-Antwort auf *A. fumigatus*

Die Hauptaufgabe des adaptiven Immunsystems in der Verteidigung gegen *Aspergillus* ist das Orchestrieren des innate Immunsystems, um den Schimmelpilz schnell und effizient zu eliminieren. CD4⁺ Th-Zellen spielen eine entscheidende Rolle während der Homöostase und in der Pathophysiologie der Aspergillose [112]. Sie sind sowohl im Patienten als auch durch die kontinuierliche *Aspergillus*-Umweltexposition bei gesunden Menschen anwesend [113-115].

Um die Th-Zell-Reaktion zu induzieren, sind Signale des innate Immunsystems nötig. EZs sezernieren Zytokine, die T-Zellen rekrutieren, aktivieren und durch eine Veränderung im Stimulationsumfeld in ihrer Th-Differenzierung beeinflussen [116-119]. Nach der Phagozytose von Konidien oder Keimschläuchen rekrutieren AMs innate Immunzellen durch die Sekretion der Zyto- und Chemokine Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF), IL-1 α , IL-1 β , IL-6, *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP)1- α , MIP-2 und TNF- α [120].

Monozyten und von Monozyten abgeleitete CD11b⁺ DCs transportieren den phagozytierten Pilz in die Lymphknoten, wo er präsentiert und eine Th-Zell-Antwort eingeleitet wird [95]. Th-Zellen werden von DCs mit Hilfe der Chemokine CC-Motief-Ligand (CCL)3, CCL4, CXCL10 und CCL20 rekrutiert [121]. Die Pilzantigene werden den Th-Zellen von DCs auf MHC-II präsentiert. Gleichzeitig werden die zur Th-Zell-Aktivierung notwendigen kostimulatorischen Liganden hochreguliert. DCs exprimieren nach *A. fumigatus*-Stimulation CD80 und CD86, die kostimulatorischen Liganden für CD28. Des Weiteren findet die Kostimulation über OX40 und seinem Liganden OX40L statt. Eine Dysregulierung dieser kostimulatorischen Moleküle wird in den allergischen Ausprägungen der Aspergillose beobachtet [122, 123]. Nach der Aktivierung der Th-Zellen, verbunden mit der autokrinen Sekretion von IL-2, beginnt die T-Zell-Proliferation und die Th-Zellen differenzieren in die verschiedenen Th-Subgruppen. Für *Aspergillus* sind vor allem Th1-, Th2- und Th17-Zellen von Belang. In welche Th-Subtypen die aktivierten Th-Zellen

differenzieren, hängt maßgeblich vom Zytokinumfeld ab. Zu diesem Umfeld tragen DCs entscheidend bei [124].

DCs können die diversen *A. fumigatus*-Morphotypen aufgrund von einer Vielzahl an PRRs unterscheiden und Morphotyp-spezifische Th-Antworten induzieren [125]. Die Unterscheidung der Morphotypen findet anhand der Zusammenstellung der Pilz-Zellwand statt. Die äußere Schicht von *A. fumigatus*-Konidien besteht aus Hydrophobinen und die innere Schicht aus Melanin. In geschwollenen Konidien kommen die Glykoproteine Chitin, Galactomannan, β -1,3/ β -1,6 und β -1,3/ β -1,4 Glucane zum Vorschein, deren Konzentration sich in Keimschläuchen und Hyphen erhöht [126]. DCs induzieren nach Stimulation mit *A. fumigatus*-Konidien einen Th1-Phänotypen durch die Sekretion von IL-12 [127]. Eine Infektion mit Hyphen führt zur Sekretion u. a. von IL-1 β , TNF α und IL-4 durch DCs [122, 128]. IL-1 β induziert die Th17-Differenzierung, während IL-4 die Th2-Differenzierung fördert [129-131]. Von DCs sezerniertes TNF- α kann während einer *Aspergillus*-Infektion sowohl einen Th2- als auch einen Th17-Phänotypen induzieren [132]. Im Gegensatz zur Stimulation mit Konidien führt eine Infektion mit Hyphen zu einem Th17-Phänotypen, der durch IL-23 Sekretion induziert wird [133]. Die Depletion von mo-DCs schwächt die Th1- und stärkt die Th17-Antwort, was für eine Rolle von mo-DCs in der Th1-Differenzierung spricht [134] (**Abbildung 2**).

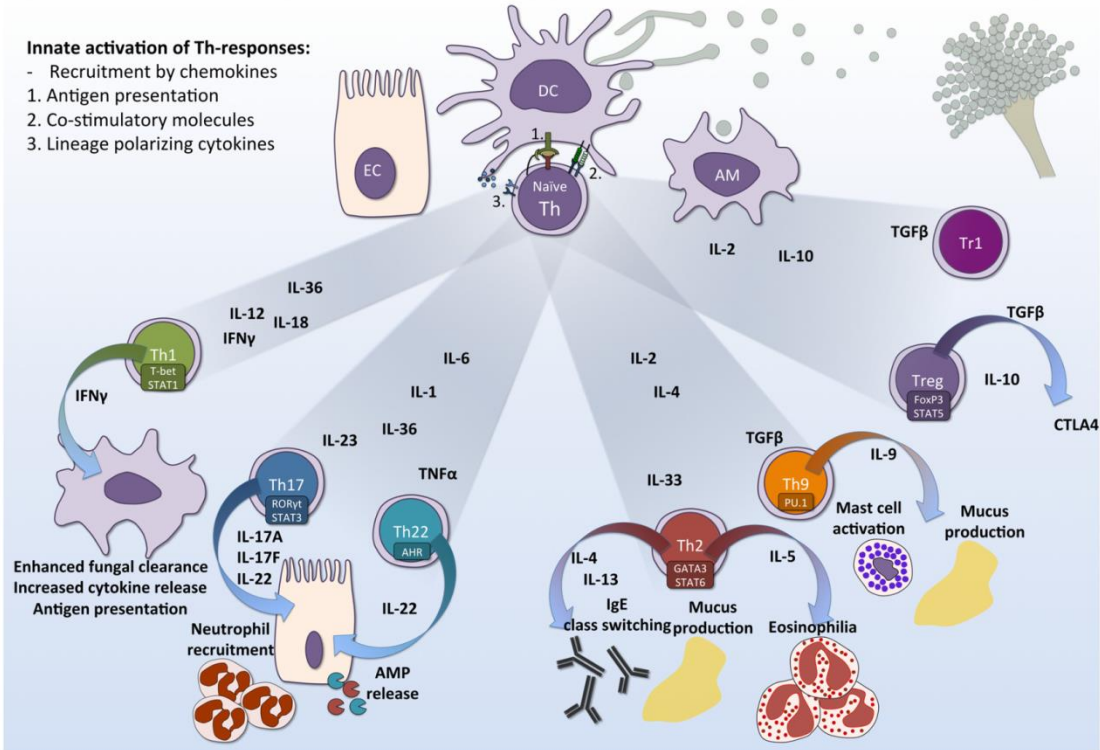


Abbildung 2: Th-Antwort auf *A. fumigatus*. Die Erkennung von *A. fumigatus* durch Zellen des innate Immunsystems via PRRs leitet die Immunantwort ein. Naive Th-Zellen werden von DCs durch Antigenpräsentation auf MHC-II Molekülen (1.), kostimulatorische Faktoren (2.) und Zytokine (3.) aktiviert. Das Zytokinumfeld wird maßgeblich von EZs, DCs und AMs beeinflusst. Die vorhandenen Zytokine bestimmen, in welche Th-Subpopulationen die naiven Th-Zellen differenzieren. Die diversen Th-Subpopulationen exprimieren spezifische Transkriptionsfaktoren und lösen durch ihre Signalzytokine unterschiedliche Effektorfunktionen aus. EC/EZ = Epithelzelle; DC = Dendritische Zelle; AM = Alveolarmakrophage; Th = T-Helferzelle; IL = Interleukin; IFN = Interferon; TGF = *Transforming growth factor*; TNF = *Tumor necrosis factor*; AMP = *Antimikrobielles Peptid*; CTLA-4 = *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*; PRRs = *Pattern recognition receptors* STAT = *Signal Transducer and Activator of Transcription*, ROR γ t = *RAR-related orphan receptor gamma t*; AHR = *aryl hydrocarbon receptor*; t-Bet = *T-boxtranscription factor 21*; GATA3 = *Transkriptionsfaktor GATA3*; PU.1 = *Transkriptionsfaktor PU.1*; FOXP3 = *Forkhead box P3*. Abbildung übernommen aus [112].

Th1-Antwort gegen *A. fumigatus*

Die allgemeinen Charakteristika der Th1-Antwort können in **Tabelle 1** gefunden werden. Spezifische T-Zellen für die *A. fumigatus*-Proteine Crf1 und Catalase, die den Aktivierungsmarker CD154 und IFN- γ exprimieren und daher einen Th1-Phänotypen ausbilden, waren bei Patienten nach alloSZT mit einer IA prädiktiv für einen guten Verlauf. Abwesenheit dieser Zellen führte zur Krankheitsprogression [114]. Bei immunkompetenten Mäusen führte die wiederholte intranasale Stimulation mit vitalen *A. fumigatus* Konidien zu einer erhöhten IL-12 Sekretion mit

subsequenter Th1-Differenzierung. Diese Mäuse waren anschließend resistent gegen eine IA [135]. Eine Sensitivierung von Mäusen mit *A. fumigatus*-Konidien und eine darauffolgende Stimulation mit einer für unsensitivierte Mäuse letalen Dosis Konidien überlebten vor allem Mäuse mit T-Zellen, die das Signalzytokin der Th1-Antwort, IFN- γ , sezernierten [136]. Die Th1-Antwort wird hauptsächlich von IL-12 induziert. Folglich senken hohe Konzentrationen von IL-12 die Suszeptibilität für die IA in Mausmodellen [135, 137]. Brieland und Kollegen berichten, dass immunkompetente Mäuse, deren Immunsystem durch die Inhalation von einer hohen Anzahl *A. fumigatus* Konidien stimuliert wurde, IL-18 vor IL-12 sezernieren und dass die Neutralisierung jeweils eines dieser beiden Zytokine zu einer reduzierten IFN- γ -Antwort führt [138]. In einem weiteren Mausmodell stieg mit der Höhe der IFN- γ -Antwort auch der Schutz vor der invasiven Aspergillose [135].

Aus diesen Studien kann geschlossen werden, dass eine starke Th1-Antwort einen protektiven Effekt bei einer *A. fumigatus*-Infektion hat. Durch eine prominente Th1-Differenzierung wird vermehrt IFN- γ ausgeschüttet, welches die Effizienz des innate Immunsystems erhöht und dadurch die Eliminierung von *A. fumigatus* steigert [139-142].

Th2-Antwort gegen *A. fumigatus*

Ein allgemeiner Überblick über die Th2-Antwort kann in **Tabelle 1** gefunden werden. Eine dominante Th2-Antwort inhibiert die Th1-Antwort und wird durch die Zytokine IL-4, IL-5 IL-10 und IL-13 charakterisiert. Sie ist maßgeblich in die Pathophysiologie von verschiedensten Hypersensitivitätskrankheiten involviert [143, 144]. In einem IA-Mausmodell wurden entweder IL-4^{-/-} oder Wildtyp-Mäuse mit *A. fumigatus*-Konidien intranasal infiziert. IL-4^{-/-} Mäuse waren weniger suszeptibel für die Entwicklung einer IA als die Wildtyp-Kontrolltiere. Diese verringerte Suzeptibilität ging einher mit einer erhöhten IFN- γ -Sekretion und daher einem gestärkten Th1-Phänotypen [145]. Konträr führte eine starke Th2-Antwort in Mausmodellen zu IA-Progression [145, 146].

Eine dysregulierte Th2-Antwort wird bei *A. fumigatus*-assoziierten Hypersensitivitätserkrankungen beobachtet. Es wird angenommen, dass knapp 20 % aller Allergene von mykologischer Abstammung sind [147, 148]. Bis heute sind 150 mykologische Allergene bekannt [149]. Die meisten hiervon sind *A. fumigatus*-Allergene [112, 148, 150]. Diese Allergene können bei atopischen Individuen oder Patienten mit einer respiratorischen Grunderkrankung, die eine fungale Kolonisation begünstigen, starke Th2-Antworten auslösen [124].

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs; beinhalten T-Zellen) von gesunden Individuen sezernieren nach *A. fumigatus*-Lysat-Stimulation IL-5 und IL-13. Verglichen mit Menschen mit niedriger *A. fumigatus*-Umweltexposition sezernieren Zellen von Spendern mit hoher Exposition erhöhte Mengen dieser zwei Zytokine [151]. PBMCs von Patienten mit ABPA sezernieren nach *A. fumigatus*-Konidien-Stimulation ebenfalls erhöhte Mengen an IL-5 und IL-13, während die IFN- γ -Sekretion inhibiert ist, was für ein gestörtes Th1/Th2-Verhältnis bei ABPA-Patienten spricht [152]. In einem ABPA-Mausmodell zeigten Mäuse eine Eosinophilie, einen pathologischen Umbauprozess der Atemwege (*Remodeling*) und erhöhte IgE Serumkonzentrationen [153]. Während IL-5-Neutralisierung die Eosinophilie aufhob, führte die alleinige Neutralisierung von IFN- γ zur Steigerung der Eosinophilie [153].

Die Ergebnisse zeigen die Wichtigkeit der Th1/Th2-Balance in *A. fumigatus*-assoziierten allergologischen Krankheitsbildern auf [124]. Die Daten deuten darauf hin, dass eine Th1-Antwort eine protektive und eine exzessive Th2-Antwort eine pathologische Wirkung bei *A. fumigatus*-assoziierten Krankheitsbildern hat.

Die Th1/Th2 dichotomische Erklärung ist jedoch nicht ausreichend, um diese Pathologien zu erklären. Auch andere Zytokine und Teile der T-Zell-Antwort spielen eine wichtige Rolle.

Th17-Antwort gegen *A. fumigatus*

Analog zur Th1- und Th2-Antwort wurde die allgemeinen Informationen zur Th-17-Antwort in **Tabelle 1** zusammengefasst. Die Th17-Antwort auf *A. fumigatus* ist ebenfalls an der Homöostase

und Pathologie beteiligt. Es wurde kürzlich gezeigt, dass die Entstehung von *A. fumigatus*-reaktiven Th17-Zellen auf einer Kreuzreaktion basiert. *A. fumigatus*-reaktive Th17-Zellen wurden im Darm durch die Konfrontation der Th-Zellen mit dem humanen kommensalen Pilz *Candida albicans* gebildet [154].

Dectin-1 ist für die Induktion der Th17-Antwort und die Elimination von *A. fumigatus* essenziell [134, 155, 156]. Dectin-1^{-/-} Mäuse zeigten eingeschränkte Th17-Antworten auf *A. fumigatus* und wiesen höhere *A. fumigatus* induzierte Mortalitätsraten auf. Diese gehen einher mit eingeschränkter Neutrophilenrekrutierung und geschwächten Effektorfunktionen von Neutrophilen und Makrophagen [155]. Neben IL-17 kontrolliert Dectin-1 auch die Produktion des Th17-Zytokins IL-22. Ein gestörtes Dectin-1 Signal führte bei Mäusen zu geringerer IL-22 Produktion und zu erhöhtem Pilzwachstum in den Lungen der Mäuse [156]. In einem weiteren Mausmodell für IA führte die Neutralisierung von IL-17 und IL-23 im Gegensatz zu diesen Daten zu verminderter Suszeptibilität gegenüber einer IA [157]. Im Gegensatz zu β -Glucan, das über Dectin-1 Th17-Antworten stärkt, unterdrückt der *A. fumigatus*-Zellwandbestandteil Galactosaminogalactan (GAG) die Th17-Antwort (und Th1-Antwort), einhergehend mit abgeschwächter Neutrophilen-Rekrutierung und erhöhter Suszeptibilität in IA-Mausmodellen [158, 159]. Obwohl die grundlegenden Krankheitsbilder unterschiedlich sind, ist bei Patienten mit Schädelbasisosteomyelitis (SBO) und Chronischer Granulomatose (CGD) die Th17-Antwort stark eingeschränkt. Beide Patientengruppen sind häufig von Infektionen mit *A. fumigatus* betroffen [160, 161].

Während eine kurzfristige, zielgerichtete Aktivierung des Th17-Arms des Immunsystems einen protektiven Effekt hat, trägt eine chronische Aktivierung der Th17-Zellen, wie sie in *A. fumigatus*-assoziierten Hypersensitivitätskrankheiten zu finden ist, zur chronischen Entzündung und Gewebeschädigungen in der Lunge bei [162, 163]. In einem Mausmodell führte die Überaktivität von IL-17 zu einer Neutrophilie, die mit einer persistierenden *A. fumigatus*-Infektion in der Lunge der Tiere assoziiert war [157]. IL-23 ist essenziell für die Aufrechterhaltung der IL-17-Antwort, da IL-23 *Knockout*-Mäuse kein IL-17 produzierten [157]. *In vitro* *A. fumigatus*-stimulierte T-Zellen von gesunden Individuen zeigen einen dominanten

Th1-Phänotypen [141, 164]. Im Gegensatz dazu differenzieren T-Zellen von COPD-Patienten hauptsächlich in Th17-Zellen [164]. *A. fumigatus* spezifische T-Zellen von CF-Patienten mit akuten, unbehandelten ABPA sind überwiegend IL-17 positiv [154].

Auch bei der Th17-Antwort spielt das Th1/Th17-Verhältnis eine wichtige Rolle. Dectin-1 Aktivierung führte zu einer verstärkten Th17-Antwort und inhibierte die Th1-Antwort. Zusätzlich resultierte eine Inhibition der Th1-Zytokine IFN- γ und IL-12 in einer prominenten Th17-Differenzierung [134]. Die Neutralisierung von IL-12 führte in einem IA-Mausmodell zu einer verstärkten Th17-Differenzierung durch erhöhte Konzentrationen von IL-23, wodurch die IA-Suszeptibilität gesteigert wurde [157]. Auch in einem weiteren Mausmodell für IA ging eine Th1-lastige Antwort mit der Beseitigung von *A. fumigatus* einher, während Mortalität mit einer Th2/Th17-lastigen Antwort in Zusammenhang gebracht wurde [165].

Zusammenfassend suggerieren die Daten, dass eine kurze, kontrollierte Th17-Aktivierung zur Beseitigung des Pilzes führt. Die Th17-Antwort ist notwendig, um die Rekrutierung und die Aktivierung von Neutrophilen, den wichtigsten Effektorzellen in der Bekämpfung von *A. fumigatus*, zu unterstützen [155, 166, 167]. Im Gegensatz dazu führt eine lange, unkontrollierte Aktivierung zu einer chronischen Entzündung und damit einhergehenden Gewebeschädigungen in der Lunge. Eine Verschiebung des Th1/Th17-Verhältnisses zu Gunsten von Th17 wird mit Pilzpersistenz in Verbindung gebracht.

Treg Antwort gegen *A. fumigatus*

Tregs kontrollieren Entzündungsreaktionen mit Hilfe von unterschiedlichen Mechanismen wie der Expression von CTLA-4 sowie der Sekretion von IL-10 und Transformierendem Wachstumsfaktor (TGF)- β [168]. Sie sind in der physiologischen Immunantwort dafür verantwortlich, eine Toleranz für harmlose Aeroantigene, wie z. B. *A. fumigatus*, zu erzeugen [169]. Von *A. fumigatus* ausgelöste Entzündungsreaktionen werden ebenfalls von Tregs inhibiert. So zeigten IL-10-*Knockout*-Varianten in einem Mausmodell für die ABPA beispielsweise erhöhte

Konzentrationen IFN- γ , IL-4 und IL-5 in Verbindung mit einer gesteigerten Entzündung der Atemwege und Mortalität nach Stimulation mit *A. fumigatus* [170].

1.4 Die T-Zell-Antwort als diagnostischer Marker

1.4.1 Einführung in die funktionellen T-Zell-Assays

Die Fähigkeit der T-Zellen, spezifisch auf diverse Pathogene zu reagieren, ermöglicht die Verwendung von T-Zell-Antworten als diagnostischem Marker. Als Ausgangsmaterial wird bei T-Zell-Assays peripheres Blut verwendet, das entweder direkt stimuliert wird oder aus dem PBMCs isoliert werden, die nach der Isolation stimuliert werden [171]. Die T-Zellen werden mit einem Antigen des zu diagnostizierenden

Pathogens, das während der Stimulation von DCs präsentiert wird, *in vitro* über eine bestimmte Inkubationsperiode stimuliert. Daraufgehend werden die Zellen auf Aktivierungsmarker und Zytokinsekretion untersucht [171-176]. Die Reaktion in der stimulierten Probe wird in der Regel mit der Reaktion in einer unstimulierten Hintergrundkontrolle und einer Positivkontrolle verglichen. Die

Hintergrundkontrolle soll eine Kontamination im

Prozess der Probengewinnung und Stimulation und/oder eine pathologische, unspezifische Reaktion des Spenders ausschließen. Als Positivkontrolle wird in der Regel ein Lektin wie z. B. Phytohämagglutinin (PHA) verwendet. Die Positivkontrolle wird verwendet, um grobe Fehler im Prozess und eine Immundefizienz des Spenders auszuschließen.

Das Immunsystem kann auch für neuartige, immuntherapeutische Ansätze zur Behandlung der IA genutzt werden. Welche Möglichkeiten in dieser Hinsicht für die Behandlung der IA bestehen, habe ich während meiner Doktorarbeit in dem Review-Artikel „*Immunomodulation as a Therapy for Aspergillus Infection: Current Status and Future Perspectives*“ zusammengefasst (siehe **Appendix 6.1**).

Zur Auslesung der T-Zell-Aktivierung werden verschiedene Methoden genutzt. Die meisten kommerziell erhältlichen T-Zell-Assays werden via *Enzyme-Linked Immuno Spot Assay* (ELISPOT) oder *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) analysiert und beschränken sich auf die Analyse von IFN- γ . Deswegen werden sie oft *IFN- γ Release Assays* (IGRAs) genannt (**Tabelle 2**) [171]. Neben ELISPOT und ELISA ist in experimentellen T-Zell-Assays die Durchflusszytometrie eine weit verbreitete Technik zur Analyse der T-Zell-Aktivierung [172-176]. Ein Überblick über die Funktionsweisen der verschiedenen Methoden wird in **Abbildung 3** gegeben.

Hersteller	T-Zell-Assay Name	Methode	Pathogen	Ausgangsmaterial für die Stimulation
Qiagen	QuantiFERON-TB	ELISA	<i>M. tuberculosis</i>	VB
Qiagen	QuantiFERON-CMV	ELISA	CMV	VB
Oxford Immunotec	T-SPOT.TB	ELISPOT	<i>M. tuberculosis</i>	PBMCs
Oxford Immunotec	T-SPOT.CMV	ELISPOT	CMV	PBMCs
Mikrogen	T-Track CMV	ELISPOT	CMV	PBMCs

Tabelle 2: Liste der geläufigsten kommerziell erhältlichen IFN- γ Release Assays (IGRAs). Abkürzungen: CMV= Cytomegalovirus, Tb = Tuberkulose.

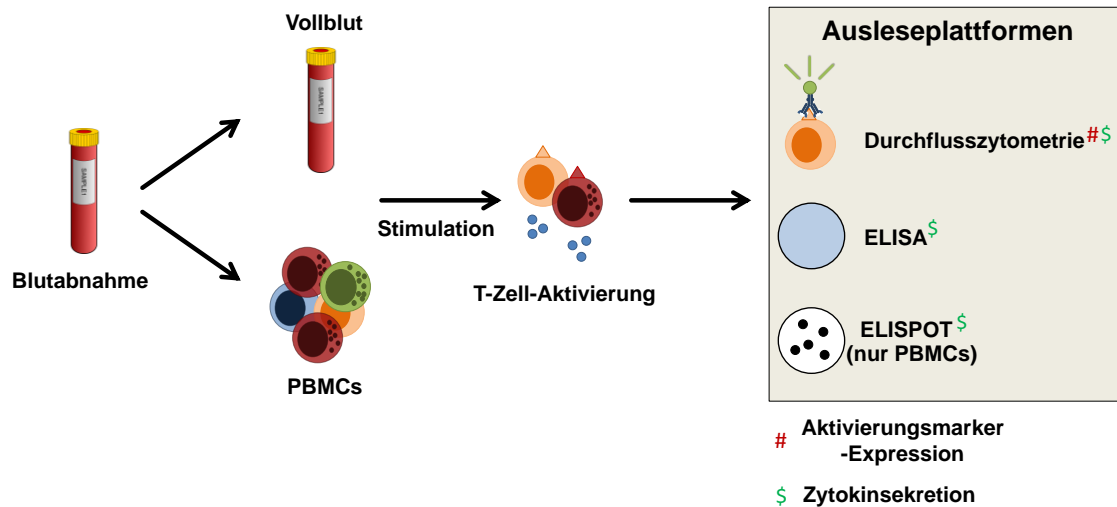


Abbildung 3: Funktionsweise von QuantiFERON, T-Track, T-SPOT und experimentellen durchflusszytometrischen Assays. Für alle T-Zell-Tests wird dem Patienten peripheres Vollblut (VB) abgenommen. Für den QuantiFERON-Test (ELISA) wird das Blut direkt in Teströhrchen entnommen, das die spezifischen Antigene enthält. Nach dem Vermengen von Blut und Antigenen wird die Suspension über Nacht inkubiert. In dieser Zeit sezernieren die aktivierten Immunzellen IFN- γ . Das Plasma wird abgenommen und in einem ELISA gemessen. Für T-Track und T-SPOT (beide ELISPOT) werden PBMCs aus dem VB isoliert und in Medium in eine ELISPOT-Platte gegeben. Dort werden die Zellen

mit spezifischen Antigenen stimuliert und über Nacht inkubiert. Auch hier geben aktivierte Lymphozyten IFN- γ ab, das direkt auf der mit Fangantikörpern beschichteten Membran der Platte gebunden wird. Nach der Inkubationszeit wird die Zellsuspension entfernt und das sich auf der Membran befindliche IFN- γ gefärbt. So entstehen die für den ELISPOT charakteristischen Punkte an den Stellen, an denen eine Immunzelle IFN- γ sezerniert hat. Diese Platten werden abschließend in einem ELISPOT *Reader* ausgelesen [171]. Die durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Aktivierung kann sowohl aus VB als auch aus PBMCs durchgeführt werden. Die Zellen werden hierbei ebenfalls über Nacht mit spezifischen Antigenen stimuliert. Danach werden die Zellen mit Antikörpern, die mit Fluorochromen konjugiert sind, markiert. Diese Antikörper können gegen eine Vielzahl von Aktivierungs- und Populationsmarkern gerichtet sein. Die stimulierten und markierten Zellen werden anschließend in einem Durchflusszytometer gemessen [172-176]. Die Durchflusszytometrie und der ELISA können sowohl mit VB als aus PBMCs durchgeführt werden, während der ELISPOT nur mit PBMCs durchgeführt werden kann.

1.4.2 T-Zell-Assays in der Klinik

Nach über 80 Jahren der Tuberkulosedagnostik mittels Tuberkulin-Hauttest (TST) haben T-Zell-Tests den Einzug in die klinische Diagnostik der Tuberkulose gefunden (**Tabelle 2**). Neben dem TST werden die IGRAs QuantiFERON(QFN)-Tuberkulose (TB) und T-SPOT.TB in der Routinediagnostik angewandt [177-179]. Die Funktionsweise von QFN-TB und T-SPOT.TB werden in **Abbildung 3** erläutert. Der QFN-Plus ist die 4. Generation und aktuelle Version des Tests und wurde im Jahr 2015 auf den Markt gebracht [180]. Der VB-basierte Test beinhaltet neben einer Hintergrundkontrolle ohne Antigen und einer Positivkontrolle zwei Stimulationsröhrchen, die als TB1 und TB2 bezeichnet werden und mittels unterschiedlicher Peptidmischungen sowohl Th-Antworten als auch die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen detektieren [181].

Im T-SPOT.TB werden PBMCs ebenfalls mit *M. tuberculosis*-Antigenen stimuliert. Auch hier werden ESAT-6- und CFP-10-Peptide zur Stimulation, eine Hintergrundkontrolle und eine Positivkontrolle verwendet [182, 183]. QFN-TB und T-SPOT.TB besitzen eine Sensitivität und Spezifität von über 90% sowie eine hohe Konkordanz der Messergebnisse untereinander [180, 184-188].

Beide Tests sind von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) zugelassen und haben neben dem Fortschritt für die Patientenversorgung auch einen sozioökonomischen Nutzen [188, 189].

Auf Grund der erhöhten Spezifität der IGRAs gegenüber dem TST können sie trotz der höheren Kosten pro Test Ausgaben für weitere Nachuntersuchungskosten einsparen und so ihren höheren Preis auch ökonomisch rechtfertigen [189]. Verglichen mit den diagnostischen Empfehlungen der *British Thoracic Society*, konnte in einer britischen Studie eine IGRA-gesteuerte Diagnostik £ 10.79 pro Patienten einsparen [190].

Auf Grund des Erfolgs im Bereich der Tuberkulose-Diagnostik wurden IGRAs auch für andere Infektionen entwickelt [191-193]. Eine der vielversprechendsten Anwendungen sind IGRAs für das Cytomegalovirus (CMV). CMV-Infektionen und -Reaktivierungen sind eine typische Komplikation bei soliden Organtransplantationen und bei der alloSZT, die zu erhöhter Morbidität, Mortalität und Transplantationsverlusten führt [194-196]. Eine frühe CMV-Reaktivierung nach alloSZT kommt meistens nur bei Patienten ohne CMV-Prophylaxe vor. Allerdings werden auch späte und repetitive CMV-Reaktivierung beobachtet, v. a. bei Patienten mit einer späten CMV-Reaktivierung auf Grund von einer verzögerten Rekonstitution des allgemeinen und CMV-spezifischen Immunsystems [197]. Mit IGRAs kann die IFN- γ -Sekretion eines einzelnen Patienten auf verschiedene CMV-Antigene gemessen werden. Anhand von Grenzwerten kann hierdurch das Risiko einer CMV-Reaktivierung abgeschätzt werden [196, 198-204]. IGRAs in Kombination mit der Detektion der CMV-Viruslast könnten so zur individuellen CMV-Risikostratifizierung genutzt werden und individuelle Therapie- und Nachverfolgungsansätze ermöglichen [196]. Es gibt drei kommerziell erhältliche IGRAs für CMV: die PBMC-basierten ELISPOTs T-SPOT.CMV und T-Track.CMV, welche die CMV-spezifische Immunantwort auf die CMV-Antigene IE-1 und pp65 messen, und den VB-basierten QuantiFERON-CMV, der die IFN- γ -Antwort auf 23 CMV-Peptidpitope quantifiziert [196, 205]. Die Funktionsweise der Assays wird in **Abbildung 3** zusammengefasst und ist analog zu den in der Tuberkulose genutzten IGRAs.

Basierend auf den klinischen Erfahrungen bei der Tuberkulose und beim CMV-Monitoring sind IGRAs ein vielsprechendes diagnostisches Werkzeug und können sowohl zur Primärdiagnose als auch zur Risikostratifizierung und individualisierten Therapiesteuerung einen wichtigen Beitrag leisten. Trotz ihrer Vorteile haben IGRAs auch potenzielle Schwächen. Hierzu zählen unter

anderem die Beeinflussung der IGRA-Ergebnisse durch präanalytische Faktoren wie verlängerte präanalytische Lagerzeit und die eingeschränkte Testgenauigkeit bei immunkompromittierten Patienten [178, 206-209]. Sowohl der TST als auch die IGRAs sind auf ein funktionierendes Immunsystem zur Diagnosestellung angewiesen. Daher nimmt die Testgenauigkeit bei immunkompromittierten Patienten ab [178, 206, 207]. Trotzdem ist die Messung auch bei diesen Patienten möglich [210-212]. Präanalytische Faktoren sind für bis zu 68 % der Fehler in der Diagnostik verantwortlich [181]. Auch bei den IGRAs haben präanalytische Faktoren wie eine längere Lagerzeit des Blutes vor Verarbeitung eine höhere Rate an nicht eindeutig auswertbaren Messungen („indeterminate“) und falsch-negative Ergebnisse zur Folge [208, 209].

1.4.3 Experimentelle T-Zell-Assays in der Diagnostik für invasive Mykosen und Schimmelpilz-Sensitivierung

Die Antworten des adaptiven Immunsystems können auch im mykologischen Feld mit T-Zell-Assays gemessen werden. Besonders im Bereich der Schimmelpilze wurde eine Vielzahl an Studien durchgeführt. Hier konzentrieren sich die Ansätze auf die Assayplattformen ELISPOT, ELISA und CD154-basierter Durchflusszytometrie.

Der **ELISPOT** wurde bereits für die Analyse von gesunden Spendern und Patienten mit invasiven Mykosen (IMI) verwendet. In einer Studie mit drei Patienten mit invasiven Mucormykosen (IM) wurden im ELISPOT IFN- γ , IL-4-, IL-10- und IL-17-sezernierende Zellen detektiert. Im Gegensatz dazu konnten keine dieser Zellen bei den 25 Kontrollpatienten ohne IM nachgewiesen werden. Die Zytokinsekretion war nur während der IM-Infektion messbar und sank nach deren Behandlung [213]. Dieselbe Arbeitsgruppe berichtete konträr zu dieser Studie, dass auch bei hämatologischen Patienten ohne IM Mucorales spezifische T-Zellen gefunden wurden. Die Mucorales-spezifischen T-Zell-Frequenzen waren allerdings bei Patienten mit wahrscheinlicher oder gesicherter IM höher als bei den Kontrollpatienten. Außerdem zeigten Patienten mit Mucorales-spezifischen T-Zellen ohne IM einen dominanten IFN- γ -Phänotypen, während die

IM-Patienten höhere Frequenzen von Mucorales-spezifischen T-Zellen, welche die Th2-Signalzytokine IL-4 und IL-10 sezernierten, aufwiesen [214].

In einer Kohorte von 22 hämatologischen Patienten mit IA konnten *A. fumigatus*-spezifische T-Zellen nach der Stimulation von PBMCs mit verschiedenen *A. fumigatus*-Antigenen via ELISPOT detektiert werden. Diese T-Zellen sezernierten hauptsächlich IFN- γ und IL-10. Bei den IA-Patienten waren die Anwesenheit von IFN- γ -produzierenden *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen sowie T-Zell-Antworten auf eine größere Anzahl von *A. fumigatus*-Antigenen prädiktiv für einen positiven Krankheitsverlauf. Auch bei gesunden Spendern wurden *A. fumigatus*-spezifische T-Zellen nachgewiesen. Die Frequenzen und die Diversität der T-Zell-Antwort waren jedoch geringer als bei den IA-Patienten [215]. Die Th-Antwort auf *A. fumigatus*-Allergene (Aspf) kann ebenfalls im ELISPOT gemessen werden. Bei gesunden Spendern lösten Aspfs eine dominante Th1-Antwort aus, wobei auch eine Th2- und Th17-Antwort gemessen werden konnte [216].

Diese Studien zeigen, dass spezifische T-Zellen gegen Schimmelpilze bei Patienten mit IMI und bei gesunden Spendern mit dem ELISPOT-Test gemessen werden können. Neben der Frequenz der Schimmelpilz-spezifischen T-Zellen kann auch der dominante Th-Phänotyp durch die Detektion der Signalzytokine im ELISPOT bestimmt werden. Hierbei bestätigen die Ergebnisse das in **Kapitel 1.3.4** dargestellte Dogma einer überwiegend protektiven Th1-Antwort und potenziell schädlichen Th2-Reaktionen gegen Schimmelerreger. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Analyse der verschiedenen Th-Antworten und der Entwicklung eines diagnostischen Tests, der diese zuverlässig und individuell messen kann. Die ELISPOT-Plattform ist hierfür geeignet, zeigt aber auch entscheidende Limitationen wie einen hohen Arbeitsaufwand durch die Notwendigkeit der PBMC-Isolation und PBMC-Kryokonservierung zur simultanen Testdurchführung von einer größeren Anzahl von Patienten.

Bei der **durchflusszytometrischen Analyse** von Schimmelpilz-spezifischen T-Zellen werden CD4⁺CD154⁺ Zellen detektiert. CD154 ist ein spezifischer Th-Zellen-Aktivierungsmarker mit geringem unspezifischem Hintergrund [113, 217, 218]. CD154⁺ Schimmelpilz-spezifische T-Zellen konnten sowohl bei gesunden Spendern, Patienten mit IM und Patienten mit allergologischen *Aspergillus*-assoziierten Krankheiten gemessen werden [113, 114, 151, 172-175, 217, 219-222].

Gesunde Individuen mit niedriger bzw. hoher *Aspergillus*-Umweltexposition können mit Messung von CD154⁺ spezifischen T-Zellen Klassifikationsgenauigkeit von ca. 85 % erkannt werden [151, 175, 222]. Zur Stimulation wurde am häufigsten ein *A. fumigatus*-Myzellysat verwendet, aber auch die Stimulation mit anderen *A. fumigatus*-Antigenen aktiviert die T-Zellen in diesem Assay [113, 114, 151, 172-175, 217, 219-222].

Die Arbeitsgruppe um Petra Bacher zeigte, dass bei Patienten mit IMIs höhere *A. fumigatus*-spezifische T-Zell Frequenzen als bei gesunden Spendern detektierbar sind. Anhand von gesunden Probanden wurde ein Grenzwert der physiologischen T-Zell-Antwort auf *A. fumigatus* von maximal 0,39 % *A. fumigatus*-spezifischen Th-Zellen nach Stimulation festgelegt. Bei IMI-Patienten werden dementsprechend teilweise höhere Frequenzen gemessen. Bei mehrfachen longitudinalen Messungen konnten IMIs mit einer Sensitivität von 90 % und einer Spezifität von 80 % erkannt werden. Der Assay konnte jedoch nur für 85,5 % der Patienten verwendet werden. Die restlichen Patienten hatten durch ihre Grunderkrankungen zu wenige Th-Zellen oder zeigten keine Reaktion auf die Positivkontrolle. Nach einer Lungenresektion bei IMI verbunden mit der Entfernung eines Großteils der Pilzlast fielen die Mucorales-spezifischen T-Zellen bei Patienten mit IMI stark ab. Dies unterstreicht den diagnostischen Wert des Assays, da nach Reduktion der Pilzlast auch die T-Zell-Antwort abfällt [172]. Auch anderen Gruppen ist es gelungen, mit diesem Assay erhöhte *A. fumigatus*-spezifische T-Zellen bei IA-Patienten zu detektieren. Wie bereits in **Kapitel 1.3.4** erwähnt, konnte die Anwesenheit von spezifischen CD154⁺ T-Zellen für die *A. fumigatus*-Antigene Crf1 und Catalase1 mit einem besseren klinischen Verlauf der IA korreliert werden [114]. In einer Studie von Steinbach und Kollegen wurden 115 Hochrisikopatienten via Detektion von antigenspezifischen CD69⁺CD154⁺ Th-Zellen auf IMIs untersucht. Dreiunddreißig Prozent der Patienten hatten analog zur bereits oben genannten Studie durch ihre Grunderkrankungen eine zu geringe Anzahl von Th-Zellen oder zeigten keine Reaktion auf die Positivkontrolle und waren deswegen nicht auswertbar. Basierend auf nur 4 gesicherten IMIs in der untersuchten Kohorte zeigte der Test eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 81 %. Außerdem besaßen knapp 20 % der Patienten mit einer möglichen IMI erhöhte spezifische T-Zell-Frequenzen. Dies könnte darauf hindeuten, dass mit diesem Test eine

bessere Unterscheidung zwischen Patienten mit IMIs und falsch positiven Befunden anderer Tests (z. B. GM) möglich sein könnte [173].

Die CD154-basierte Durchflusszytometrie wurde ebenso im allergologischen Bereich angewendet [113, 154, 223]. Hierzu wurden *A. fumigatus*-spezifische CD4⁺CD154⁺ Zellen zusätzlich für unterschiedliche Zytokine gefärbt. Eine dominante Th2-Antwort wurde bei allergologischen Patienten anhand von CD4⁺CD154⁺IL4⁺, CD4⁺CD154⁺IL5⁺ und CD4⁺CD154⁺IL13⁺ spezifischen Th-Zellen gemessen [113]. Bei ABPA-Patienten wurde mit dem Assay ebenfalls eine dominante Th2-Antwort auf *A. fumigatus*-Allergene detektiert [223]. CD154⁺IL4⁺IL17⁺ Th-Zellen waren indikativ für eine akute, unbehandelte ABPA, während die Detektion von CD154⁺IL4⁺ Th-Zellen ohne IL17 eine akute, unbehandelte ABPA nicht nachweisen konnte [154]. Einschränkend ist im Hinblick auf die drei allergologischen Publikationen zu erwähnen, dass die spezifischen T-Zellen, die im Assay detektiert wurden, magnetisch selektiert und über einen langen Zeitraum expandiert wurden.

Die vorgestellten Daten zeigen, dass die Detektion von *A. fumigatus*-assoziierten Hypersensitivitätskrankheiten und IMIs via CD154 möglich ist. IMIs werden mit hoher Sensitivität und Spezifität detektiert, jedoch ist die Messung bei einer großen Anzahl der Patienten nicht auswertbar. Die Zeit, die zur Expansion der T-Zellen in vielen Protokollen zur Messung benötigt wird, erschwert die Verwendung dieser Protokolle in der klinischen Praxis stark. Alle hier beschriebenen durchflusszytometrischen Assays basieren auf der Isolation von PBMCs. Auf der Grundlage dieser Assays haben wir einen VB-basierten CD154-Assay entwickelt, der günstiger, zeitsparender sowie einfacher in der Durchführung ist und ein geringeres Blutvolumen benötigt. Mit diesem Assay wurden bei gesunden Probanden höhere *A. fumigatus*-spezifische CD4⁺CD154⁺ Frequenzen im Vergleich zur PBMC-basierten Methode gefunden, was für eine höhere Sensitivität des VB-Tests gegenüber des PBMC-basierten Tests sprechen könnte. Dies muss sich allerdings noch in relevanten Patientenkollektiven bestätigen [174].

Obwohl der Einsatz von **ELISAs** für Schimmelpilze in der direkten Detektion des Pilzes beispielsweise via Galactomannan weit verbreitet ist, gibt es nur wenige Daten zur Anwendung

funktioneller T-Zell-ELISAs in der medizinischen Mykologie [13]. Page und Kollegen berichteten, dass die PBMCs von gesunden Spendern mit hoher Umweltexposition von Schimmelpilzen im Vergleich mit niedrigexponierten Individuen nach Stimulation mit *A. fumigatus* einen Trend zu erhöhten Konzentrationen von IL-5, IL-13 und IL-17A im ELISA zeigten. Erhöhte Konzentrationen von IL-5 wurden bei denselben Spendern auch nach Stimulation mit der Mucorales-Spezies *Rhizopus arrhizus* gefunden. Die Zytokinmarker erhöhten die Differenzierungsfähigkeit der CD154-Durchflusszytometrie zwischen niedrig- und intensivumweltexponierten, gesunden Spendern. Ausschließlich anhand der Zytokinkonzentrationen konnte die Differenzierung der beiden Gruppen jedoch nicht vollzogen werden. Eine zusätzliche Limitation war, dass die PBMCs für diesen Assay für 120 Std. inkubiert wurden, was ungünstig für einen potenziellen, diagnostischen Einsatz ist [151]. Im Weiteren klinischen, mykologischen Feld wurde ein VB-basierter IGRA für den dimorphen Pilz *Histoplasma capsulatum* (HC) entwickelt und in einer Kohorte von 126 Individuen getestet. Zwischen den Kohorten der Genesenen und den Nichtinfizierten erreichte der Test eine Sensitivität von 70 - 92 % und eine Spezifität von 85 - 95 % in Abhängigkeit des verwendeten Antigens [224]. Kritisch bleibt trotz der hohen Sensitivität und Spezifität anzumerken, dass besonders immunkompromittierte Patienten ein hohes Risiko in Hinblick auf eine kritische HC-Infektion haben [225, 226] und die Aussagekraft des Tests unter akuter Immunsuppression noch nicht evaluiert wurde. Des Weiteren wird, wie bei Tuberkulose- und CMV-Assays, nur IFN- γ quantifiziert, was für eine Diagnose von *A. fumigatus* unzureichend sein könnte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass große Anstrengungen unternommen werden, einen funktionellen T-Zell-Assay für *A. fumigatus*-assoziierte Erkrankungen zu entwickeln. Hierfür wurden die Plattformen ELISPOT, ein auf CD154-basierter durchflusszytometrischer Assay und in wenigen Studien der ELISA genutzt. Einige Herausforderungen für T-Zell-Tests werden aus den Daten deutlich. Hochrisikopatienten für IMI sind meistens immunkompromittiert. Da die Infektion indirekt über die Immunreaktion des Patienten diagnostiziert werden soll, wird der Assay von Wirtsfaktoren wie Immunsuppression und Immunrekonstitution stark beeinflusst [172, 173]. Die Anwesenheit von spezifischen T-Zellen bei gesunden Probanden bedeutet, dass eine hohe Assaypräzision erforderlich ist, um Grenzwerte

definieren zu können und vermehrte falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden. Eine limitierte präanalytische Robustheit einiger für die Immunantwort von *Aspergillus* wichtiger Th-Fraktionen (v. a. Th-17) stellt für IGRAs erhöhte Anforderungen dar.

1.5 Zielsetzung

Die aktuelle Diagnostik sowohl für die IA als auch für *A. fumigatus*-assoziierte Hypersensitivitätskrankheiten basiert auf mehreren Säulen. Für die unterschiedlichen Krankheitsformen sind die Diagnose via Anamnese, Grunderkrankung, Immunstatus, Symptomatik und einer Reihe von diagnostischen Tests notwendig. Einzelne diagnostische Tests sind nicht leistungsstark genug, um *A. fumigatus*-assoziierte Krankheiten zu diagnostizieren [8, 13]. Die Tests weisen *A. fumigatus* direkt nach und sind nur einmalig positiv (Kultur, GM und PCR-Test) oder sie sind unspezifisch und bleiben u. U. für eine lange Zeit positiv (CT-Scan) [13, 227, 228]. Die Vielzahl der zu berücksichtigenden Faktoren sowie die Unzuverlässigkeit und Schwächen der einzelnen diagnostischen Tests führen häufig zu späten oder falschen Diagnosen, die durch eine verzögerte oder inkorrekte Therapie zu einer erhöhten Mortalität und verstärkten Symptomatik beitragen [13, 34, 51]. Daher besteht eine große Notwendigkeit im Hinblick auf neue diagnostische Assays sowohl für die IA als auch für die *A. fumigatus*-assoziierten Hypersensitivitätskrankheiten.

T-Zell-Assays sind vielversprechende diagnostische Tests, die bereits in der Routinediagnostik der Tuberkulose eingesetzt werden [180, 181] und neben der Intensität potenziell auch die Art der Immunantwort evaluieren könnten. Für Schimmelpilze gibt es aktuell allerdings nur wenige experimentelle T-Zell-Assays und es besteht kein Konsensus, welche Plattform (ELISA, ELISPOT oder Durchflusszytometrie) am besten für diese Anwendung geeignet ist. Daher ist das Hauptziel dieser Arbeit **die Entwicklung und Evaluation eines praxistauglichen, funktionellen T-Zell-Assays zur Detektion der humanen Immunantwort auf das opportunistische Pathogen *A. fumigatus***. Dieses Ziel soll durch die folgenden spezifischen Arbeitspakete erreicht werden:

1.) Evaluation der präanalytischen Limitationen in der Literatur beschriebener T-Zell-Assays

Falsch-positive und falsch-negative diagnostische T-Zell-Assay-Testergebnisse können auf Grund einer veränderten Immunantwort durch Kryokonservierung und/oder präanalytische Lagerzeit entstehen. Wir werden daher den Einfluss einer präanalytischen Lagerzeit von 6 Std. und von drei unterschiedlichen Kryokonservierungsbedingungen auf die Detektion von *A. fumigatus*-

spezifischen T-Zellen mit den geläufigsten PBMC-basierten T-Zell-Assays (ELISPOT, Durchflusszytometrie, ELISA) untersuchen. Die Identifikation einer möglichst robusten Assay-Plattform für T-Zell-Assays zur Detektion von *A. fumigatus*, die trotz präanalytischer Lagerzeit und Kryokonservierung ein belastbares Testergebnis erzielen kann, ist unabdingbar, da auf Grund der geringen Inzidenzen *Aspergillus*-assoziierter Krankheitsbilder zukünftig multizentrische Studien mit entsprechenden logistischen Herausforderungen realisiert werden sollten.

2.) Entwicklung eines klinisch anwendbaren VB-basierten ELISAs für *A. fumigatus*

VB-basierte T-Zell-Assays erfordern weniger aktive Arbeitszeit, sind kostengünstiger und einfacher zu standardisieren, benötigen ein geringeres Blutvolumen sowie eine weniger komplexe Laborausstattung und besitzen ein physiologischeres Stimulationsumfeld als PBMC-basierte Systeme. Wir streben deshalb an, einen VB-basierten ELISA für die Detektion von *Aspergillus*-assozierten Krankheitsbildern zu entwickeln. Dieser Assay soll auf seine Reproduzierbarkeit und Robustheit gegenüber präanalytischer Lagerzeit sowie seiner Leistungsfähigkeit in einer Patientenkohorte mit *Aspergillus*-assozierten Lungenerkrankungen untersucht werden. Die erfolgreiche Entwicklung eines VB-basierten ELISAs für die Detektion von *A. fumigatus* würde die klinische Anwendbarkeit stark verbessern und multizentrische Studien vereinfachen.

3.) Evaluation der Immunantwort von Probanden mit intensiver beruflicher *A. fumigatus*-Exposition

Intensive berufliche *A. fumigatus*-Exposition kann zu allergischen Erkrankungen beitragen (siehe **Kapitel 1.2.3.2**). Wir werden daher mit Hilfe von verschiedenen T-Zell-Assays die Immunantwort von beruflich intensiv exponierten, gesunden Landarbeitern analysieren und Unterschiede in der Immunantwort dieser gesunden Probanden zu Patienten mit *Aspergillus*-assozierten Hypersensitivitätskrankheiten untersuchen. Diese Studie wird somit Unterschiede zwischen einer physiologischen und pathophysiologischen Immunantwort auf *A. fumigatus*-Exposition identifizieren und eruieren, ob T-Zell-Assays potenziell auch für umweltmedizinische Fragestellungen geeignet sind.

4.) Vergleichende Evaluation verschiedener T-Zell-Assays bei immunkompromittierten Patienten

Neben Patienten mit *Aspergillus*-assoziierten Hypersensitivitätskrankheiten sind IAs, die hauptsächlich bei immunkompromittierten Patienten vorkommen, eine wichtige und auf Grund der Einschränkungen des Immunsystems herausfordernde Patientenkohorte für funktionelle T-Zell-Tests (siehe **Kapitel 1.2.1**). Wir werden überprüfen, ob T-Zell-Assays zur Detektion der opportunistischen Erreger *A. fumigatus* und CMV bei immunkompromittierten Patienten nach alloSZT geeignet sind. Hierfür werden wir Patientenproben an drei unterschiedlichen Zeitpunkten nach alloSZT mit verschiedenen Assay-Plattformen analysieren, deren technische Durchführbarkeit und deren Konkordanz zur CMV-Serologie untersuchen. Aus den Ergebnissen kann abgeleitet werden, ob und, wenn ja, welche T-Zell-Assays für die Detektion von *A. fumigatus* bei immunkompromittierten Patienten geeignet sein könnten und ob sich weitere infektiologische Anwendungsoptionen der getesteten Assays über *A. fumigatus* hinaus ergeben können.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Technische Ausrüstung

2.1.1.1 Kühl- und Gefrierschränke

Comfort	Liebherr
MedLINE	Liebherr
Premium	Liebherr

2.1.1.2 Vortexer

Harmony Mixer Uzusio VTX-3000L	LMS Laboratory and Medical Supplies
Vortex-Genie 2	Scientific Industries

2.1.1.3 Heizblock

neoBLOCK 1	neoLab
------------	--------

2.1.1.4 Zentrifugen

Fresco 17 Centrifuge	Thermo Scientific
Megafuge 16 Centrifuge	Thermo Scientific
Multifuge 3s	Thermo Scientific
Sunlab Mini-Zentrifuge	neoLab
Galaxy Mini-Zentrifuge	VWR International

2.1.1.5 Sterilwerkbank

HERAsafe HS	Thermo Electron Corporation
-------------	-----------------------------

2.1.1.6 Inkubatoren

HERACELL 150i CO ₂ Incubator	Thermo Scientific
HERATHERM Incubator	Thermo Scientific
Minitron	INFORS HT
HERACELL 240	Thermo Scientific

2.1.1.7 Geräte und Materialien zur Dosierung von Flüssigkeiten

Accu-Jet Pro	Brand
BD Discardit II Spritzen	Becton Dickinson Biosciences
BD Eclipse Needle 20G	Becton Dickinson Biosciences
BD Plastipak 1 ml	Becton Dickinson Biosciences
Biosphere Filter Tips	Sarstedt
Pipettierhilfe Macro	Brand
Mikroliterpipetten Research Plus	Eppendorf
Multipette M4	Eppendorf
Pasteur Pipette 3 ml	Biosigma
Serologische Pipetten Cellstar	Greiner bio-one

2.1.1.8 Waagen

KERN 440-33N	Kern & Sohn GmbH
KERN AEJ 120-4M	Kern & Sohn GmbH

2.1.1.9 Reaktions- und Kryogefäße

Reaktionsgefäße 5 ml, PP	Nerbe plus
Cellstar-Gefäße 15 ml/50 ml	Greiner bio-one
SafeSeal Reaktionsgefäße	Sarstedt
CryoTube vials	Thermo Fisher Scientific
Mr. Frosty Kryokonservierungsgefäß	Nalge Nunc International

2.1.1.10 Materialien zur Blutabnahme

Cutasept F Haut-Desinfiziens	BODE Chemie
Gazin Mullkomresse	Lohmann und Rauscher
Leukomed Wundverband	BSN medical
Multi-Adapter	Sarstedt
S-Monovette 2,7 ml	Sarstedt
S-Monovette 2,7 ml K3E	Sarstedt
S-Monovette 7,5 ml Z	Sarstedt
S-Monovette 7,5 ml LH	Sarstedt
Venenstaubinde	Megro
Venofix Safety 19G	B. Braun Melsungen AG

2.1.1.11 Materialien für Zellisolation und -kultur

Zellkulturplatte, 96 Vertiefungen, Flachboden/Rundboden	Falcon
Filtropur S 0,2	Sarstedt
Hypodermic Needle-Pro Needle 23G	B. Braun Melsungen AG
Whole Blood Columns	Miltenyi Biotec
MACS Multistand	Miltenyi Biotec
Sterican Mix Halbstumpf, G 18	B. Braun Melsungen AG
Leukosep™ 50 mL Röhrchen	Greiner Bio-One
MidiMACS™ Cell Separator	Miltenyi Biotec

2.1.1.12 Geräte und Materialien zur Zellzählung

Zählkammer Neubauer Improved	Assistent und Marienfeld
Vi-Cell XR counter	Beckmann Coulter
Vi-Cell 4 mL Sample Vial	Beckmann Coulter

2.1.1.13 Geräte und Materialien für die Durchflusszytometrie

5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes	Falcon
BD FACSCalibur (Serien-Nr.: 6420)	Becton Dickinson Biosciences
CytoFLEX AS34240	Beckmann Coulter
Contrad 70	Beckmann Coulter
CytoFLEX Sheath Fluid	Beckmann Coulter
FACS Clean	Becton Dickinson Biosciences

FACS Flow	Becton Dickinson Biosciences
FACS Rinse	Becton Dickinson Biosciences
FlowClean Cleaning Agent	Beckmann Coulter

2.1.1.14 Geräte und Materialien für den ELISPOT

IFN- γ ELISPOT	Lophius Biosciences
IFN-5 ELISPOT	Lophius Biosciences
IFN-13 ELISPOT	Lophius Biosciences
IFN-17 ELISPOT	Lophius Biosciences
BioReader 5000a	BioSYS

2.1.1.15 Geräte und Materialien für den ELISA und Multiplex-Zytokinassays

NanoQuant infinite M200 PRO	Tecan
HydroFlex™ ELISA Waschgerät	Tecan
Microplate Shakers with 4-Place Platform (Model No.: 88861024)	Fisherbrand
Plastipak 1 mL Spritzen	Becton Dickinson Biosciences
Eclipse Needle with SmartSlip-Technology 20 G (0,9 mm x 40 mm)	Becton Dickinson Biosciences
IFN- γ (ELISA MAX Deluxe Kit)	BioLegend
IL-17 (ELISA MAX Deluxe Kit)	BioLegend
Schwefelsäure (2N)	Carl Roth
MILLIPLEX HCYTOMAG 14-plex	EMD Millipore (Merck)

MILLIPLEX MAP Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel	EMD Millipore (Merck)
Luminex200 <i>Reader</i>	Luminex

2.1.2 Reagenzien

2.1.2.1 Reagenzien und Kits zur Herstellung und Qualitätskontrolle von Zellstimulanzen

Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG
<i>Aspergillus fumigatus</i> Lysat	Miltenyi Biotec
<i>Aspergillus fumigatus</i> Lysat	Hergestellt von der Gruppe von Herrn Dr. Kniemeyer (Hans-Knöll-Institut, Jena)
Aspf1, Aspf3, Aspf4, Aspf6, Aspf8, Aspf9(Crf1), Aspf22, CatB, CipC, CsnB, Hly, Pst2	Hergestellt von der Gruppe von Herrn Prof. Frank Ebel (Ludwig-Maximilians-Universität München)[229]
T-activated Phosphoprotein (pp)65	Lophius Biosciences
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad
Endochrome-K Assay Kit	Charles River

2.1.2.2 Reagenzien und Materialien für die Zellisolation und -kultur

Anti-CD28 pure – functional grade, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD40 pure – functional grade, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD49d pure, human	Miltenyi Biotec
Biocoll Separating Solution (1,077 g/ml)	Biochrom und Merck
EDTA salt solution	Sigma-Aldrich
Hanks' buffered salt solution (HBSS)	Sigma-Aldrich

Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich
T-activated proteins CMV pp65	Lophius Biosciences
Phytohemagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich
RPMI-Medium 1640 + GlutaMAX	Gibco
Dimethylsulfoxid (DMSO) – Lösung Ph.Eur.	Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg
CTL-Wash (10x)	C.T.L. Europe
L-Glutamin 200 mM	GIBCO
AIM-V + AlbuMAX (BSA) (1x) Medium	GIBCO
ELISPOT-Färbungslösung	Lophius Biosciences
CTL-Test Medium	C.T.L. Europe
Tween-20	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
StraightFrom Whole Blood CD3 MicroBeads	Miltenyi Biotec
Humanes AB serum	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich

2.1.2.3 Reagenzien und Kits für Immunfluoreszenzfärbungen

7-AAD Staining Solution	Miltenyi Biotec
Annexin V Apoptose Detektions Kit (beinhaltet Annexin V Puffer, Annexin V und Propidiumiodid)	Becton Dickinson Biosciences
Anti-Annexin V-APC	Becton Dickinson Biosciences

Anti-CD3-Vioblue, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD3-PerCP, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD3-FITC, human	Becton Dickinson Biosciences
Anti-CD3-FITC, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD4-FITC, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD4-FITC, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD4-FITC, human	Becton Dickinson Biosciences
Anti-CD4-VioBlue, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD8-FITC, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD8-PerCP, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD8-PerCP, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD11b-APC, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD14-PerCP-Vio 700, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD14-PerCP, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD16-PerCP, human	BioLegend
Anti-CD19-APC, human	BioLegend
Anti-CD45RA-VioGreen, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD56-APC, human	Becton Dickinson Biosciences
Anti-CD62L-PE, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD66b-FITC, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD66b-PE, human	Becton Dickinson Biosciences

Anti-CD69-PE-Vio615, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD107a (LAMP-1)-PE-Vio770, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD154-APC, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD154-APC, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD154-PE-Vio770, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD183 (CXCR3)-PE-Vio615, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD196 (CCR6)-APC, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-CD197 (CCR7)-PE, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-HLR-DR-PE, human	Becton Dickinson Biosciences
Anti-IFN-g-PE, human	Miltenyi Biotec
Anti-IFN-g-PE, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-IFN- γ -APC-Vio770, REAfinity, human	Miltenyi Biotec
Anti-IL-5-PE, human	Miltenyi Biotec
Anti-IL-13-PE, human	Miltenyi Biotec
Anti-IL-17-PE, human	Miltenyi Biotec
Brefeldin A	Sigma-Aldrich
GolgiStop	Becton Dickinson Biosciences
Erythrocyte lysis buffer	Qiagen
Inside Stain Kit	Miltenyi Biotec
Invitrogen L/D fixable near-IR	ThermoFisher

2.1.3 Software

BD CellQuest Pro Version 0.3.9f7B	Becton Dickinson Biosciences
BioReader 12.1 Software	BioSYS
CytExpert 1.2	Beckmann Coulter
Kaluzza Version 2.1	Beckmann Coulter
FLOWJO Single Cell Analysis Software Version 10.6.1 und Version X.0.7	FlowJo, LLC
i-Control 1.12	Tecan
EndoScan V software 4.0 (SP1)	Charles River
Microsoft Office 2010	Microsoft
P Value from Pearson (R) Calculator	Social Science Statistics
Wilcoxon-Mann-Whitney Test Calculator	Saarland University
Prism v8	GraphPad

2.2 Methoden

2.2.1 Probandenakquise und Klassifizierung

2.2.2 Akquise von Blutspendern und Klassifizierung der Schimmelpilzexposition

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Mycoses 2018	Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020
Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021a	Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021b

Nach Aufklärung und freiwilliger, schriftlicher Einwilligung wurden 18- bis 75-jährige Blutspender in die Studie eingeschlossen. Positive Ethikvoten der Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit den Kennzeichen 34/15 und 78/16 sowie der *National Health Service, Health Research Authority* mit dem REC Kennzeichen 19/SC/0645 wurden vor dem Beginn der Studien eingeholt.

Ausschlusskriterien für den Einschluss gesunder Spender wurden wie folgt definiert:

- Schwangerschaft oder Stillen
- Einnahme von Immunsuppressiva oder Immunmodulatoren in den letzten 12 Wochen
- Vakzinierung oder Einnahme von Antiinfektiva in den letzten 4 Wochen
- Akute oder chronische Infektionserkrankung
- Insulinpflichtiger Diabetes mellitus
- Vorausgegangene Teilnahme an derselben Versuchsserie dieser Studie
- Vulnerable Personengruppe

Diese Ausschlusskriterien wurden bereits veröffentlicht [151, 175, 222] und der Probandenerfassungsbogen ist im **Appendix 6.2** abgebildet.

Anhand eines Fragebogens zur Höhe der Schimmelpilzexposition wurden Probanden in gering- und intensivexponierte Spender unterteilt. Im Fragebogen wurden Langzeitexposition, Exposition im beruflichen bzw. Wohnumfeld sowie die Exposition in der Wohnung einschließlich des Gartens und der Kellerräume abgefragt. Probanden mit Langzeitexposition sowie einem

aktuellen Expositionsfaktor (Exposition im beruflichen Umfeld, Exposition im Wohnumfeld und Exposition innerhalb des Wohnbereichs) oder mit drei aktuellen Expositionsfaktoren wurden als intensiv-, die übrigen als geringexponierte Probanden klassifiziert. Die (Sub-)Expositionskategorien sind in **Tabelle 3** erläutert. Der Frage- und Auswertungsbogen ist im **Appendix 6.3** abgebildet. Dieser Fragebogen und die darin enthaltenen Kriterien wurden in vorhergehenden Publikationen validiert [151, 175, 222].

Expositionsfaktor-Kategorie	Expositionsfaktoren (eine Kategorie wurde als positiv angesehen, wenn ein Proband mindestens einen Faktor aufweist)
Langzeitexposition	<ul style="list-style-type: none"> • Leben in ruralem Wohnort mit weniger als 2000 Einwohnern oder in einer Kleinstadt mit weniger als 20000 Einwohnern bei gleichzeitiger Anwesenheit von landwirtschaftlichen Betrieben/Nutzflächen (inkl. Weinbau) bzw. holzverarbeitender Industrie im Umkreis von 1 km für mindestens 5 Jahre • Exposition im beruflichen Umfeld für mindestens 5 Jahre
Exposition im beruflichen Umfeld	<ul style="list-style-type: none"> • Intensiver Kontakt mit organischen Abfällen • Intensiver Kontakt mit landwirtschaftlichen Rohstoffen • Verarbeitung von Holz oder Holzprodukten • Sanierungs- bzw. Renovierungsarbeiten in Altbauten • Längerer Aufenthalt in schimmelbelasteten Räumen inkl. Büroräumen • Intensiver Umgang mit Pflanzen, inkl. Topfpflanzen und Hydrokultur • Umgang mit Klimaanlage, Abluftanlagen oder Kühltechnik • Sonstige Arbeiten, bei denen intensiver Umgang mit Schimmelpilzen bestanden haben könnte (nach Angabe des Probanden)
Exposition im Wohnumfeld	<ul style="list-style-type: none"> • ruraler Wohnort mit weniger als 2000 Einwohnern • landwirtschaftliche Betriebe/Nutzflächen (inkl. Weinbau) bzw. holzverarbeitende Industrie im Umkreis von 1 km
Exposition innerhalb des Wohnbereichs	<ul style="list-style-type: none"> • Eigener Nutzgarten • Teichanlage, Wasserlauf oder ähnliche Anlagen im Gartenbereich • Zimmerspringbrunnen oder Aquarium • Topfpflanzen inkl. Hydrokultur im Wohn- oder Schlafbereich • Haltung von Haustieren (jeglicher Art) • Intensive Nutzung von Kellerräumen, z. B. als Lagerräume • Bekannte Schimmelpilzbelastung in der Wohnung oder dem Wohngebäude

Tabelle 3: Expositionsfaktor-Kategorien und Subkategorien. Expositionsfaktor-Kategorien und -Subkategorien, die eine Einschätzung über die Intensität der Schimmelpilzexposition eines Individuums ermöglichen. Probanden mit Langzeitexposition sowie einem aktuellen Expositionsfaktor (Exposition im beruflichen Umfeld, Exposition im Wohnumfeld und Exposition innerhalb des Wohnbereichs) oder mit drei aktuellen Expositionsfaktoren wurden als intensiv-, der Rest als geringexponierte Probanden klassifiziert [152, 175, 231].

Der ökologische Anbau durch die in der Studie eingeschlossenen Biobauern wurde nach der Verordnung für ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen (834/2007) anhand von Zertifikaten der folgenden Kontrollstellen nachvollzogen: Demeter (DE-ÖKO-022), Naturland, A-B-CERT (DE-ÖKO-06), Kontrollverein ökologischer Anbau e.V. (DE-ÖKO-022).

Folgende Patienten wurden für die unterschiedlichen Studien eingeschlossen:

Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020:

In die Studie wurden 13 Patienten eingeschlossen, von denen insgesamt 35 Proben gewonnen wurden. Die Altersspanne betrug 35 – 69 Jahre, in der Kohorte befanden sich 8 Männer und 5 Frauen. Den Patienten nach alloSZT wurde an drei verschiedenen Zeitpunkten Blut abgenommen. Bei zwei Patienten konnte nur eine Messung durchgeführt werden, ehe die Patienten verstarben. Die genauen Patientencharakteristika sind in Suppl. Materiel 2 im Anhang zur Publikation (**Kapitel 3.4.1**) [230] zusammengefasst. Die Blutentnahmezeiträume wurden wie folgt definiert: Blutentnahme 1: Woche 7 – 11; Blutentnahme 2: Woche 11 – 15; Blutentnahme 3: Woche 18 – 25.

Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021a:

Folgende Patienten mit chronischen *Aspergillus*-assoziierten respiratorischen Erkrankungen oder Kontrollpatienten mit respiratorischen Erkrankungen ohne Schimmelpilzassoziation wurden am *University Hospital of Wales* in die Studie eingeschlossen:

- 2 Patienten mit CF und erhöhten *Aspergillus*-spezifischen IgE (Altersspanne 41 – 47, 1 Mann, 1 Frau)
- 3 Patienten mit ABPA (Altersrange 33 – 83, 1 Mann und 2 Frauen)

- 4 Patienten mit CPA (Altersrange 60 – 80, 3 Männer und 1 Frau)
- 5 Kontrollpatienten (Altersrange 56 – 90, 4 Männer und 1 Frau)

2.2.2.1 Blutentnahme

Nach zweifacher, 30 sekundlicher Desinfektion der Einstichstelle wurde venöses Blut mit Hilfe einer *Venofix Safety* 19G Kanüle in S-Monovetten (Sarstedt) abgenommen. Die S-Monovetten beinhalteten das Antikoagulans Lithium-Heparin für die funktionalen Assays, EDTA zur Blutbildbestimmung der Probanden oder ein Koagulans zur Serumgewinnung. Folgende Blutvolumina wurden den Spendern entnommen:

- Lauruschkat et al., Mycoses 2018: 150 mL Lithium-heparinisieretes Blut, 2,7 mL EDTA Blut und 15 mL Serum
- Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020: 30 mL Lithium-heparinisieretes Blut
- Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021b: 75 mL Lithium-heparinisieretes Blut, 2,7 mL EDTA Blut und 35 mL Serum
- Für alle anderen Experimente wurde das Blutvolumen nach folgenden Richtlinien abgeschätzt: Für Lithium-heparinisieretes Blut wurde bei der PBMC Isolation von 1×10^6 PBMCs/mL Blut ausgegangen und für die VB-Systeme wurden 500 μ L Blut pro Stimulationsröhrchen benötigt.

2.2.3 Herstellung der Stimuli und Stimulusqualitätskontrollen

2.2.3.1 Herstellung von *A. fumigatus*-Myzellysate und -Proteinantigenen

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020	Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021a
Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021b	

Das *A. fumigatus*-Myzellysat wurde von Miltenyi Biotec erworben. Nachdem die Produktion von der Firma eingestellt wurde, wurde ein ähnliches Lysat von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Kniemeyer (Hans-Knöll-Institut, Jena) bereitgestellt. Die Produktionsmethodik wurde von der Arbeitsgruppe in [231] beschrieben.

Das Miltenyi-*A. fumigatus*-Myzellysat wurde in den Publikationen und in der Datenakquise für folgende Abbildungen verwendet:

- Lauruschkat et al., Mycoses 2018
- Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021a; Abbildung 1 und 5

Die *A. fumigatus*-Proteinantigene wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Frank Ebel (Ludwig-Maximilians-Universität München, München), wie in [229, 231] beschrieben, produziert.

2.2.3.2 Endotoxinmessung von *A. fumigatus*-Myzellysat und -Proteinantigenen

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020	Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021a
Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021b	

Die Endotoxinmessung des *A. fumigatus*-Myzellysat und der Proteinantigene wurde von der Firma Lophius Biosciences durchgeführt. Hierbei wurden die Konzentrationen mit Hilfe des Endochrome-K-Assay-Kits und der EndoScan V Software 4.0 (SP1) quantifiziert. Die Messung wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Für den VB-ELISA wurde ein sehr konservativer Grenzwert von 1 Endotoxineinheit/mg (EU/mg) Antigen festgelegt. Für den ELISPOT wurde ein Grenzwert von 3,7 EU/mg von Frau Sonja Etter in ihrer Doktorarbeit (noch nicht erschienen) bei uns im Labor bestimmt. Die in der Durchflusszytometrie benutzten Stimulanzen waren alle industriell hergestellt bzw. befanden sich unter dem Grenzwert von 1 EU/mg Antigen.

2.2.4 PBMC-basierte Methoden

2.2.4.1 Gewinnung von autologem Serum

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Mycoses 2018	Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021b
----------------------------------	---

Die befüllten Serum-Monovetten wurden bei 3000 g und Raumtemperatur (RT) für 7 min zentrifugiert, woraufhin das Serum entnommen wurde. Mit Hilfe eines 0,2 µm Spritzenvorsatzfilters wurde das Serum sterilisiert und in 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert. Zur Inaktivierung des Komplementsystems wurden die Proben bei 56 °C für 30 min inkubiert. Wenn kein Serum zur Verfügung stand, wurde das autologe Serum durch humanes AB Serum ersetzt.

2.2.4.2 PBMC-Isolation, -Quantifikation und -Viabilitätskontrolle

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Mycoses 2018	Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020
Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021b	

Vor der Blutentnahme wurden 50 mL Leukosep-Röhrchen mit 15 mL Ficoll-Lösung befüllt. Einundzwanzig mL Lithium-heparinisertes Blut wurden mit 7 mL PBS verdünnt und mittels serologischer Pipette in das obere Kompartiment eingefüllt. Die Zellen wurden bei 800 g und RT für 15 min zentrifugiert. Bei diesen und den folgenden Zentrifugationsschritten wurden die Bremse und die Beschleunigung der Heraeus Megafuge 16 auf 5 gestellt. Die PBMC-Schicht wurde mit einer Pasteurpipette in ein 50 mL Cellstar-Gefäß abgenommen, mit HBSS [232] oder CTL Wash (alle anderen Publikationen) auf 45 mL aufgefüllt und bei 400 g und RT für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die PBMCs in 1 mL HBSS [232] oder CTL Wash (alle anderen Publikationen) aufgenommen. Für die Veröffentlichung Lauruschkat et al., Mycoses, 2018 wurden die PBMCs in einer Neubauerzählkammer gezählt (wie im nächsten Abschnitt beschrieben), für die restlichen Publikationen wurde die Zellzählung auf den Vi-Cell

XR Counter umgestellt. Hierfür wurde 10 µL Zellsuspension mit 190 µL HBSS in einem Vi-Cell 4 mL Sample Vial verdünnt und in den Zellzähler gegeben.

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Mycoses 2018

In einer 96-Well-Platte wurde 50 µL Trypanblau und 40 µL Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 GlutaMAX™ + 5 % autologes Serum mit 10 µL der Zellsuspension vermischt. Zehn Mikroliter aus dieser Mischung wurden in einer Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Die PBMCs wurden für die folgenden Analysen aufgeteilt: 8×10^5 für die durchflusszytometrische Oberflächenmarkeranalyse, 4×10^6 für den ELISPOT, 1×10^7 für sowohl die funktionelle, durchflusszytometrische Analyse als auch Multiplex-Zytokinassays und $3,0 - 5,5 \times 10^7$ für jede der drei Kryokonservierungsbedingungen (siehe **Kapitel 2.2.4.3**), je nach PBMC-Ertrag des jeweiligen Spenders. Alle Konditionen wurden mit HBSS auf 10 mL aufgefüllt, ein zweites Mal bei 400 g und RT für 10 min gewaschen und in das adäquate Medium aufgenommen. Die PBMCs für durchflusszytometrische- und Multiplex-Zytokinassays wurden in RPMI + 5 % autologem Serum, die PBMCs für den ELISPOT in AIM-V AlbuMAX™ aufgenommen. Die Medien zur Kryokonservierung können in **Kapitel 2.2.4.3** und **Tabelle 4** gefunden werden.

2.2.4.3 PBMC-Kryokonservierung

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Mycoses 2018

Nach der in **Kapitel 2.2.4.2** beschriebenen Zellzählung und dem finalen Waschschrift wurden die PBMCs in drei verschiedenen Medien kryokonserviert (**Tabelle 4**). Die Zellen wurden in jedem Medium in einer Konzentration von $1 \times 10^7/900$ µL aufgenommen. Kurz vor der Kryokonservierung wurden 100 µL Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugefügt, was zu einer Endkonzentration von $1 \times 10^7/\text{mL}$ führte. Aliquots von jeweils 1 mL wurden in CryoTubes gegeben

und in einem mit 2-Propanol befüllten Mr. Frosty-Kryokonservierungsbehälter bei -80 °C eingefroren. Das 2-Propanol wurde nach fünf Kryokonservierungs-/Auftauzyklen erneuert. Nach 72 - 96 Stunden wurden die befüllten *Cryotubes* in flüssigen Stickstoff überführt, in dem sie 2 - 4 Wochen gelagert wurden.

	RPMI + FCS	RPMI + autol. Ser.	AIM-V
Kryomedium	50 % RPMI 40 % FCS 10 % DMSO	70 % RPMI 20 % autol. Ser. 10% DMSO	90 % AIM-V 10% DMSO
Auftaumedium	90 % RPMI 10 % FCS	95 % RPMI 5 % autol. Ser.	AIM-V
Waschmedium nach Auftau	RPMI	RPMI	AIM-V
Regenerationsmedium	90 % RPMI 10 % FCS	95 % RPMI 5 % autol. Ser.	AIM-V
Kulturmedium Durchflusszytometrie und Multiplex-Zytokinassay	95 % RPMI 5 % autol. Ser.	95 % RPMI 5 % autol. Ser.	95 % RPMI 5 % autol. Ser.
Kulturmedium ELISPOT	AIM-V	AIM-V	AIM-V

Tabelle 4: Medien der Publikation Lauruschkat et al., Mycoses, 2018. Die Medien in dieser Tabelle wurden für die Publikation Lauruschkat et al., Mycoses, 2018 verwendet (übersetzt aus Lauruschkat et al., Mycoses, 2018) [232]. Abkürzungen: autol. Ser. = autologes Serum; FCS = fetales Kälberserum; RPMI = Roswell Park Memorial Institute Medium.

Tabelle 2.2.4.3: PBMC-Auftau- und -Regenerationsphase

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Mycoses 2018

1 mL der auf 37 °C vorgewärmten Auftaumedien (siehe **Tabelle 4**) wurde tropfenweise auf das jeweilige Aliquot gegeben. Die Suspension wurde tropfenweise in ein 50 mL Röhrchen überführt,

das das 20 mL Auftaumedium beinhaltet. Das Kryokonservierungsröhrchen wurde noch zweimal mit der Zellsuspension gespült, um den Zellverlust zu minimieren. Nach einem Zentrifugationsschritt von 400 g für 10 min mit voller Bremse und Beschleunigung wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden erneut in 20 mL auf 37 °C erwärmtem Medium (siehe **Tabelle 4**) aufgenommen. Alle weiteren Zentrifugationsschritte in diesem Abschnitt wurden analog hierzu ausgeführt. Die PBMCs wurden erneut zentrifugiert, in 300 µL HBSS gelöst und gezählt (wie in **Kapitel 2.2.4.2** beschrieben). Achthunderttausend PBMCs wurden für die Zelloberflächenfärbung benutzt. Der Rest der Zellen wurde im Regenerationsmedium (siehe **Tabelle 4**) bei einer Konzentration von 5×10^6 PBMCs/mL bei 37 °C und 5 % CO₂ für 16 - 18 Std. bei einem Winkel von 5 ° (wie in der Literatur empfohlen [233]) in einer T25-Zellkulturflasche inkubiert. Nach der Regenerationsphase wurden die Zellen in ein 50 mL Cellstar-Gefäß überführt und die T25-Zellkulturflasche mit 10 mL RPMI oder AIM-V (in Abhängigkeit vom Kryokonservierungsmedium) gewaschen und ebenfalls in das zugehörige 50 mL Cellstar-Gefäß gegeben. Die PBMCs wurden erneut zentrifugiert und anschließend in 300 µL HBSS aufgenommen. Nach einer erneuten Zellquantifizierung wurden die Zellen für die folgenden Analysen aufgeteilt: 8×10^5 für die durchflusszytometrische Oberflächenmarkeranalyse, 4×10^6 für den ELISPOT, 1×10^7 sowohl für die funktionelle, durchflusszytometrische Analyse als auch für den Multiplex-Zytokinassay.

2.2.4.4 Zelluläre Komposition und durchflusszytometrische Viabilitätsbestimmung

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Mycoses 2018

Die Zellviabilität wurde nach der PBMC-Isolation, der -Kryokonservierung und der -Regenerationsphase bei der Zellquantifizierung mithilfe von Trypan Blau ermittelt (siehe **Kapitel 2.2.4.2**).

Die Leukozyten-Komposition wurde via Durchflusszytometrie von Zelloberflächenmarkern bestimmt. Fünfundneunzig Mikroliter HBSS + 0,5 % autologes Serum wurden mit den passenden

Antikörpern für jedes benötigte durchflusszytometrische *Panel* angereichert (Färbemedium). Zweihunderttausend PBMCs wurden im passenden Färbemedium für 20 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 mL Waschpuffer abgestoppt. Danach wurden die gefärbten Zellen in 200 μ L HBSS aufgenommen und in 5 ml *Polystyrene Round-Bottom Tubes* überführt. Abschließend wurden die gefärbten Zellen am Durchflusszytometer ausgelesen. Die verwendeten Antikörper sind in **Tabelle 5** zusammengestellt.

Die Lymphozytenviabilität wurde ebenfalls via Durchflusszytometrie analysiert. Hierfür wurde der Annexin V-Bindungspuffer und das Propidiumiodid aus dem Annexin V-Apoptose-Detektions-Kit benutzt. Allerdings wurde der α -Annexin V-FITC-Antikörper aus dem Kit durch einen α -Annexin V-APC-Antikörper vom selben Hersteller (Becton Dickinson Biosciences) ersetzt. In ein 5 ml *Polystyrene Round-Bottom Tube* wurden 2×10^5 PBMCs überführt und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Die Waschschrte fanden bei 400 g und RT für 5 min mit voller Beschleunigung und Bremse statt. Nachdem der Überstand nach dem zweiten Waschschrte verworfen wurde, wurden die PBMCs in 100 μ L Bindungspuffer, der mit den passenden Antikörpern angesetzt wurde, resuspendiert. Die Inkubationszeit wurde im Dunkeln ausgeführt und betrug 15 min. Anschließend wurden 400 μ L Bindungspuffer hinzugefügt und die gefärbten PBMCs innerhalb von 1 Std. gemessen. Die hinzugefügten Antikörper werden in **Tabelle 5** spezifiziert.

Fluorochrom		Mycoses, 2018				Open Forum Infect Dis., 2020	J Fungi (Basel), 2021b
		Zell-populationen Panel 1	Zell-populationen Panel 2	Viabilitätsfärbung	T-Zell-Aktivierung Panel 1,2,3,4	T-Zell-Aktivierung	T-Zell-Aktivierung/Differenzierung
VioBlue	Marker (Hersteller)					CD4 (MB)	CD4 (MB)
VioGreen	Marker (Hersteller)						CD45RA (MB)
FITC	Marker (Hersteller)	CD3 (MB)	CD4 (BD)	CD3 (MB)	CD4 (MB)		CD8 (MB)
PE	Marker (Hersteller)	HLR-DR (BD)	CD66b (BD)	PI (BD)	IFN- γ /IL-5/13/17 (MB)	IFN- γ (MB)	CCR7 (MB)
PE-Vio615	Marker (Hersteller)						CXCR3 (MB)
PerCP	Marker (Hersteller)	CD14 (MB)	CD8 (MB)		CD3 (MB)		7-AAD (MB)
PE-Vio770	Marker (Hersteller)						CD154 (MB)
APC	Marker (Hersteller)	CD56 (BD)	CD19 (BL)	Annexin V (BD)	CD154 (MB)	CD154 (MB)	CCR6 (MB)
APC-Vio770	Marker (Hersteller)						IFN- γ (MB)

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die PBMC-basierte Durchflusszytometrie. Antikörper für die Durchflusszytometrie der Veröffentlichung Lauruschkat et al., Mycoses, 2018, Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020 und Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021b. **Extrazelluläre Färbung;** **Intrazelluläre Färbung;** Abkürzungen: APC = Allophycocyanin, BD = Becton Dickinson, BL = Biologend, FITC = Fluorescein-5-isothiocyanat, MB = Miltenyi Biotec, PE = phycoerythrin, PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein, VB = Vollblut

2.2.4.5 PBMC-Stimulation und -Ernte für die PBMC-basierte Durchflusszytometrie

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Mycoses 2018	Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020
Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021b	

Die PBMCs wurden in einer Konzentration von 1×10^7 in RPMI + 5 % autologem Serum resuspendiert. Einhundert Mikroliter (1×10^6 PBMCs) wurden pro Vertiefung in eine 96-Well-Platte mit flachem Boden gegeben. Nach einer Stunde \pm 15 min Regenerationsphase wurden die PBMCs stimuliert. Die Stimulationsbedingungen sind in **Tabelle 6** beschrieben. Nach weiteren 2 Stunden Inkubationszeit wurde jede Probe mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Brefeldin A versetzt. Danach wurden die Zellen 18 - 20 Std. bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für die Ernte wurde ein Waschpuffer aus HBSS plus 0,5 % autologem Serum angesetzt. Der Überstand aus einer Vertiefung wurde in jeweils ein 2 mL Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden die Vertiefungen mit 200 μL Waschpuffer gefüllt. Zur Ernte wurden die PBMCs mit einer 1000 μL Pipettenspitze vorsichtig vom Boden der Vertiefung gekratzt, zum entsprechenden Überstand gegeben und bei 400 g und 4 °C für 5 min mit voller Beschleunigung und Bremse zentrifugiert.

	α -CD28	α -CD49d	AfuLy	pp65	PHA
Konzentration	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Unstimulierte Kontrolle	X	X			
AfuLy Stimulation	X	X	X		
pp65 Stimulation	X	X		X	
Positivkontrolle					X

Tabelle 6: Die verwendeten Stimuli und deren Konzentrationen sowie die verwendeten kostimulatorischen Faktoren und deren Konzentrationen für die PBMC-basierte Durchflusszytometrie. X zeigt an, dass die Komponente in der jeweiligen Kondition benutzt wurde. AfuLy = *A. fumigatus* Lysat (sowohl AfuM (Miltenyi) als auch AfuJ (HKI Jena) wurden in der gleichen Konzentration eingesetzt).

2.2.4.6 *A. fumigatus*-spezifische T-Zell-Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Mycoses 2018	Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020
Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021a	Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021b

Alle benötigten Antikörper zur Zelloberflächenfärbung wurden in 100 µL Waschpuffer (HBSS + 0,5% autologem Serum) pro Probe angesetzt. Jede Probe wurde in 95 µL der Antikörperlösung für die Oberflächenfärbung resuspendiert und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 1 mL Waschpuffer abgestoppt und die Proben wurden zentrifugiert. Dieser und alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte der Zellfärbung wurden bei 400 g und 4 °C für 5 min mit voller Beschleunigung und Bremse durchgeführt. Für die intrazelluläre Färbung wurde das *Inside Stain* Kit von Miltenyi Biotec verwendet. Der Fixierpuffer wurde 1:1 mit HBSS verdünnt. Von dem verdünnten Fixierpuffer wurden 400 µL auf die Proben gegeben und gründlich resuspendiert. Anschließend wurden die Proben für 20 min im Dunkeln inkubiert und bei 400 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Einhundert Mikroliter *Inside Perm* wurden je Probe mit den passenden Antikörpern angesetzt. Jede Probe wurde in 95 µL der Lösung resuspendiert und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Proben erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 200 µL HBSS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 5 ml *Polystyrene Round-Bottom Tubes* überführt und am Durchflusszytometer ausgelesen. Details zu den benutzten Antikörpern der Oberflächen- und intrazellulären Färbung können der **Tabelle 5** entnommen werden.

2.2.4.7 Messung und Analyse der durchflusszytometrischen Daten

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Mycoses 2018	Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020
Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021a	Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021b

Ausgelesen wurden die Proben mit dem FACS Calibur (BD) oder dem Cytoflex AS34240 (Beckman Coulter) Durchflusszytometer. Kaluza v.2.1 oder FlowJo v.X.0.7 und v.10.6.1 wurden zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten verwendet.

2.2.4.8 ELISPOT

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Mycoses 2018	Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020
Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021b	

Es wurden IFN- γ -, IL-5-, IL-13- und IL-17-ELISPOT-Platten genutzt. Hierbei wurde IFN- γ im 1-Schritt- und die restlichen Zytokine im 2-Schritt-Detektionsverfahren durchgeführt. Die PBMCs wurden auf 2×10^6 PBMCs/mL in entweder AIM-V ALBUMAX [232] oder CTL Test (alle anderen Publikationen) eingestellt und mit kostimulatorischen Faktoren angereichert (**Tabelle 7**). Daraufhin wurden 100 μ L der PBMC-Lösung in jede Vertiefung der ELISPOT-Platte gegeben und mit den entsprechenden Stimuli (**Tabelle 7**) stimuliert.

Zytokine		α -CD28	α -CD40	α -CD49d	AfuLy	AfuPA	pp65	PHA
	Konzentration	1 μ g/mL	1 μ g/mL	1 μ g/mL	50 μ g/mL	30 μ g/mL	3 μ g/mL	6 μ g/mL
IFN- γ /IL-5	Uns. Kontrolle	X		X				
IFN- γ /IL-5	AfuLy Stimulation	X		X	X			
IFN- γ /IL-5	AfuPA	X		X		X		
IFN- γ	pp65 Stimulation	X		X			X	
IL-13	Uns. Kontrolle	X	X					
IL-13	AfuLy Stimulation	X	X		X			
IL-13	AfuPA	X	X			X		
IL-17	Uns. Kontrolle							
IL-17	AfuLy Stimulation				X			
IL-17	AfuPA					X		
IFN- γ , IL-5/13/17	Positivkontrolle							X

Tabelle 7: Verwendete Stimuli und deren Konzentrationen sowie die verwendeten kostimulatorischen Faktoren und deren Konzentrationen für den ELISPOT. X zeigt an, dass die Komponente in der jeweiligen Kondition angewandt wurde. Abkürzungen: IL = Interleukin, IFN = Interferon, PHA = Phytohaemagglutinin, AfuLy = *A. fumigatus*-Lysat (sowohl AfuM (Miltenyi) als auch AfuJ (HKI Jena) wurden in der gleichen Konzentration eingesetzt), AfuPA = *A. fumigatus*-Proteinantigene, Uns. Kontrolle = Unstimulierte Kontrolle

Anschließend wurden die Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. IFN- γ -ELISPOT-Platten wurden für 24 \pm 2 Std. und die restlichen Platten zur Detektion anderer Zytokine wurden für entweder 40 \pm 2 Std. (Lauruschkat et al., Mycoses, 2018) oder 44 \pm 2 Std. (Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021b) inkubiert. Nach dem Ende der Stimulationszeit wurden die PBMCs verworfen und die Platten sanft auf Papiertüchern ausgeklopft. Die nachfolgenden Waschschr

folgendermaßen ausgeführt: Die leeren Vertiefungen wurden mit 200 µL Waschpuffer befüllt, der Waschpuffer anschließend verworfen und die Platte sanft auf Papiertüchern ausgeklopft. Zunächst wurden die Platten 6-mal mit PBS + 0,05 % Tween-20 gewaschen. Danach wurden 100 µL der Detektionsantikörperlösung in jede Vertiefung gegeben. Die Detektionsantikörperlösung, bestehend aus dem passenden Detektionsantikörper für das jeweilige Zytokin der ELISPOT-Platte, wurde in Verdünnungspuffer (DB) gelöst (**Tabelle 8**). Die Platten wurden für 2 Std. mit der Detektionsantikörperlösung inkubiert und anschließend 3-mal mit PBS + 0,05 % Tween-20 gewaschen und 3-mal mit PBS gewaschen.

Beim **1-Schritt-Detektionsverfahren** (nur IFN- γ) wurden daraufhin 50 µL Färbungslösung in die Vertiefungen gegeben und die Platte für 6 – 7 min im Dunkeln inkubiert. Die Platte wurde sanft mit Leitungswasser ausgespült. Abschließend wurde die Platte sanft von beiden Seiten auf Papiertüchern abgeklopft, über Nacht getrocknet und wieder zusammengesetzt. Das Auslesen der Platten wurde auf einem BioReader 5000a mit der BioReader 12.1 Software durchgeführt. Die genauen Detektionseinstellungen des Bioreaders sind in Lauruschkat et al., Mycosis, 2018, *Supplementary Table 2c (3.1.1)* beschrieben.

Beim **2-Schritt-Detektionsverfahren** wurde anschließend an den Waschschrift, der auf die Inkubation mit dem primären Detektionsantikörper folgt, 100 µL vom Avidin- HRP-Zweitantikörper in die Vertiefungen gegeben und für 30 min inkubiert, woraufhin 6-mal mit PBS gewaschen und die Platte ausgeklopft wurde. Danach wurde wie beim 1-Schritt-Verfahren die Färbungslösung hinzugegeben und analog zum 1-Schritt-Verfahren fortgefahren. Alle Verdünnungen der Antikörper für den ELISPOT können in **Tabelle 8** gefunden werden.

Antikörper	Verdünnung	Puffer
IFN- γ Detektionsantikörper (HRP-konjugiert)	1:300	DB Puffer
IL-5 Detektionsantikörper	1:1000	DB Puffer
IL-13 Detektionsantikörper	1:1000	DB Puffer
IL-17 Detektionsantikörper	1:1000	DB Puffer
Avidin – HRP	1:1000	DB Puffer

Tabelle 8: Die für den ELISPOT verwendeten Antikörper, deren Verdünnung und der verwendete Verdünnungspuffer. **Abkürzungen.** DB = Verdünnungspuffer (*dilution buffer*), HRP = Meerrettichperoxidase, IL = Interleukin (Tabelle übernommen aus dem T-Track ELISPOT Handbuch des Herstellers Lophius Biosciences).

2.2.5 VB-basierte Methoden

2.2.5.1 Vorbereitung von Stimulationsröhrchen für Vollblut-ELISA und Vollblut-basierte Durchflusszytometrie

Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020	Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021a
Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021b	

Zur vereinfachten Handhabung wurde eine 2,7 ml S-Monovette ohne (Anti)koagulanz in ein 15 mL Cellstar-Gefäß gesteckt. Die Mastermixe für die unterschiedlichen Konditionen wurden nach **Tabelle 9** angesetzt. Die S-Monovette wurde steril geöffnet, mit 500 µL des Mastermix befüllt und steril wieder verschlossen. Die so hergestellten Stimulationsröhren wurden bei -20 °C für eine maximale Lagerzeit von 4 Wochen aufbewahrt.

	α -CD28	α -CD49d	AfuLy	Aspf4/Aspf 6	pp65	PHA	RPMI
Konzentration im einsatzfähigen Stimulationsröhrchen	2 µg/mL	2 µg/mL	100 µg/mL	60 µg/mL	6 µg/mL	10 µg/mL	add 500 µL
Finale Konzentration nach der Injektion von 500 µL VB	1 µg/mL	1 µg/mL	50 µg/mL	30 µg/mL	3 µg/mL	5 µg/mL	n/a
Unstimulierte Kontrolle	X	X					X
AfuLy Stimulation	X	X	X				X
Aspf4/6 Protein Stimulation	X	X		X			X
pp65 Stimulation	X	X			X		
Positiv Kontrolle						X	X

Tabelle 9: Ansätze für den VB-ELISA. X zeigt an, dass die Komponente in der jeweiligen Kondition benutzt wurde.

Abkürzungen: AfuLy = *A. fumigatus*-Myzellysat, CD = *cluster of differentiation*, n/a = unzutreffend, PHA = Phytohemagglutinin, pp65 =Phosphoprotein 65, RPMI = Roswell Park Memorial Institute medium, VB = Vollblut (adaptiert und übersetzt aus Lauruschkat et. al., J Fungi (Basel),2021a)

2.2.5.2 VB-ELISA

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020	Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021a
Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021b	

Die Stimulationsröhrchen wurden am Tag des Einsatzes aufgetaut. Nachdem die Röhrchen auf RT gebracht und desinfiziert wurden, erfolgte die Injektion von 500 µL Blut mittels einer Insulinspritze, deren Nadel durch die Membran der 2,7 ml S-Monovette gestochen wurde. Das Blut wurde mit der Stimulationslösung durch 10-maliges Invertieren durchmischt und bei 37 °C für 24 – 26 Std. inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und bei 2000 g für 20 min zentrifugiert. Die Überstände wurden mit einer 100 Mikroliterpipette entnommen. Die Überstände jeder Probe wurden in verschiedene 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert, um wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen zu verhindern, und bei -20 oder -80 °C kryokonserviert.

2.2.5.3 Konventionelle ELISA-Analysen

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020	Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021a
Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021b	

Für konventionelle ELISAs und Luminex-Assays wurden die gewonnenen Serum- und Zellüberstandsproben mit RPMI verdünnt (**Tabelle 10**).

Zytokin (ELISA Hersteller)	Unstimuliert	AfuLy	Aspf4/Aspf6	PHA
IFN- γ (Biolegend)	1:2	1:2	1:2	1:24
IL-8 (Biolegend)	1:10	1:10	-	1:40
IL-17 (Biolegend)	unverdünnt	unverdünnt	unverdünnt	1:4
MIP-1 α (R&D)	1:2	1:2	1:2	1:8
Luminex Assay	1:2	1:2	1:2	1:2

Tabelle 10: RPMI-Verdünnungsfaktor der gewonnenen Serum- und Zellüberstandsproben für konventionelle ELISAs und Luminex-Assays. Abkürzungen: AfuLy = *A. fumigatus*-Myzellysat, IL = Interleukin, IFN = Interferon, PHA = Phytohemagglutinin

Konventionelle ELISA-Produkte wurden von zwei verschiedenen Firmen durchgeführt. IFN- γ , IL-8 und IL-17 wurden von Biolegend erworben und nach Herstellervorgaben ausgeführt. Die Angaben des Herstellers für das Ansetzen der Reagenzien wurde in **Tabelle 11** übernommen.

Material	Verdünnung mit
2.4 mL <i>Coating</i> Puffer A (5X)	9.6 mL deionisiertes Wasser
60 μ L <i>Capture</i> Antikörper (200X)	12 mL 1X <i>Coating</i> Puffer A
12 mL <i>Assay Diluent</i> A (5X)	48 mL PBS
60 μ L <i>Detection</i> Antikörper (200X)	12 mL 1X <i>Assay Diluent</i> A
12 μ L Avidin HRP (1,000X)	12 mL 1X <i>Assay Diluent</i> A
5,5 mL TMB <i>Substrate</i> Lösung A	5,5 mL TMB <i>Substrate</i> Lösung B

Tabelle 11: Vorbereitung und Verdünnungen der Reagenzien für eine Platte ELISA. Abkürzungen: HRP = Meerrettichperoxidase (übersetzt und adaptiert aus [234])

Zuerst wurden die Platten am Vorabend mit 100 μ L verdünnter Fangantikörperlösung beschichtet und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Nach 16 – 18 Std. wurden die Platten 5-mal mithilfe eines ELISA Wascheräts gewaschen. Hierfür wurde als Waschpuffer PBS + 0,05 % Tween-20 benutzt. Nach den Waschsritten wurden die Platten auf Papier ausgeklopft, um die restliche Flüssigkeit aus den Vertiefungen zu entfernen. Die nachfolgenden Waschsritte wurden analog durchgeführt. Nach Vollendung des ersten Waschsritts wurde zum Blockieren unbesetzter Bindungsstellen der Platte in jede Vertiefung 200 μ L 1X *Assay Diluent* A gegeben und die Platten wurden für 1 Std. auf einem Schüttler bei 750 rpm mit einem zirkulären Orbit von 0.25 cm geschüttelt. Diese Geschwindigkeit des Schüttlers wurde auch für die folgenden Inkubationsschritte benutzt. Währenddessen wurden die Standards nach Herstellerangaben angesetzt und eine 2-fache Verdünnungsreihe angelegt. Gleichzeitig wurden die Proben aufgetaut. Nach der Inkubationszeit des Blockierungspuffers wurde ein erneuter Waschsritt durchgeführt. Anschließend wurden 100 μ L von jeder Standardverdünnung und Probe in die entsprechenden Vertiefungen gegeben und die Platten wurden für 2 Std. geschüttelt. Nach einem

weiteren Waschschrift wurde 100 μL von der Detektionsantikörperlösung in jede Vertiefung gegeben und die Platten wurden für 1 Std. geschüttelt. Dieser Vorgang wurde nach der Inkubationszeit ein weiteres Mal mit der Avidin-HRP-Lösung mit einer lediglich 30-minütigen Inkubation unter Schütteln wiederholt. Danach wurde die Platte 10-mal gewaschen und 100 μL TMB-Substrat-Lösung in jede Vertiefung pipettiert. Nach der vom Hersteller vorgeschlagenen Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 1 M Schwefelsäure gestoppt und im NanoQuant infinite M200 PRO ausgelesen. Hierfür wurde eine Wellenlänge von 450 nm bei einer Referenzwellenlänge von 570 nm verwendet.

Im MIP1- α konventionellen ELISA wurde der Fangantikörper mit PBS verdünnt. Vom verdünnten Fangantikörper werden 100 μL in jede Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert und die Platte über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte mit dem ELISA-Waschgerät gewaschen. Hierbei wurde die sich in den Vertiefungen befindliche Flüssigkeit abgesaugt und 400 μL Waschpuffer (PBS + 0,05 % Tween-20) in jede Vertiefung gegeben. Dieser Schritt wurde 2-mal wiederholt. Nach dem Waschen wurde die Platte auf einem Papiertuch abgeklopft. Danach wurde die Platte mit 300 μL *Reagent Diluent* (PBS + 1 % bovines Serumalbumin) für 1 Std. bei RT geblockt. In der Zwischenzeit wurden der Standard und die Proben ebenfalls mit *Reagent Diluent* angesetzt bzw. verdünnt (**Tabelle 10**). Nachdem die Platte für eine Stunde geblockt wurde, wurde sie erneut gewaschen. Anschließend wurden 100 μL von den Proben und dem Standard in jede Vertiefung gegeben und auf RT für 2 Std. inkubiert, woraufhin ein weiterer Waschschrift folgte. Der Detektionsantikörper wurde in *Reagent Diluent* verdünnt und 100 μL von dieser Verdünnung wurden in jede Vertiefung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Std. bei RT und einem weiteren Waschschrift wurden 100 μL des im *Reagent Diluent* verdünnten Streptavidin-HRP-Zweitantikörpers in jede Vertiefung pipettiert. Die Platte wurde bei RT im Dunkeln für 20 min inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Abschließend wurden die Addition der Substratlösung, Inkubation, das Abstoppen der Farbreaktion und das Auslesen der Platte wie oben beschrieben ausgeführt.

Zur Berechnung der Zytokinkonzentrationen wurde der Wert der Hintergrundkontrolle des ELISAs von den stimulierten ELISA-Werten subtrahiert. Die ermittelten Konzentrationen, die aus

einer 7-Punkt-Standardkurve interpoliert wurden, wurden abschließend mit dem Verdünnungsfaktor verrechnet.

2.2.5.4 T-Zell-Depletion

Verwendet in:

Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021a

Die Säulen aus dem *Whole Blood Column Kit* wurden am MidiMACS™ *Cell Separator* befestigt und mit 3 mL PBS + 0,5 % humanem AB Serum äquilibriert. Heparinisiertes Vollblut wurde mit 50 µL *StraightFrom Whole Blood CD3 MicroBeads* vermischt und die Suspension wurde für 10 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden das mit den *Beads* angereicherte Blut und Vollblut ohne *Beads* als Vergleichsprobe auf die Säulen gegeben. Der Durchfluss wurde in 50 mL Cellstar-Gefäßen aufgefangen und in 2 mL Reaktionsgefäße aliquotiert, um die Aufnahme des Durchflusses in eine Diabetesspritze zu ermöglichen. Die Stimulationsröhrchen wurden wie in **Kapitel 2.2.5.1** angesetzt und, wie in **Kapitel 2.2.5.2** beschrieben, mit CD3-depletiertem bzw. nicht-depletiertem Vollblut beimpft und 10-mal invertiert. Diese Röhrchen wurden entweder in konventionellen ELISAs, wie in **Kapitel 2.2.5.3** beschrieben, gemessen oder für die VB-ELISA Durchflusszytometrie (siehe **Kapitel 2.2.5.5**) genutzt.

2.2.5.5 VB-basierte Durchflusszytometrie

Verwendet in:

Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021a

Die Stimulationsröhrchen mit CD3-depletiertem und nicht-depletiertem Blut wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für Granulozyten- und NK-Zell- Analysen betrug die Stimulationszeit 6 Std., während T-Zellen nach 24 Std. analysiert wurden. Für NK-Zell- und T-Zell-Analysen wurden 10 µg/mL Brefeldin A und 0,67 µL/mL BD GolgiStop nach 2 (NK-Zell-Analyse) bzw. 4

Std. (T-Zell-Analyse) hinzugegeben. Details zu den verwendeten Fluoreszenz-markierten Antikörpern sind in **Tabelle 12** zusammengefasst.

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020
--

Die Stimulationsröhrchen für die unspezifische Hintergrundkontrolle, *A. fumigatus*-Myzellysat, pp65 und PHA (nach **Kapitel 2.2.5.1** angesetzt) wurden aufgetaut und 500 µL Lithium-heparinisertes Vollblut wurden, wie in **Kapitel 2.2.5.2** beschrieben, durch die Membran der S-Monovetten injiziert. Die Inkubation fand bei 37 °C und 5 % CO₂ für 18 -20 Std. statt, wobei nach 2 Std. Stimulation 10 µg/mL Brefeldin A in die Stimulationsröhrchen gegeben wurde.

Ab diesem Punkt verwendet in:

Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020
--

Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021a

Nach der Inkubationszeit wurde das VB von den Stimulationsröhrchen in jeweils 15 mL-Gefäße überführt. Danach wurden die Proben mit 1 mL 0,5 M EDTA verdünnt, 5-mal invertiert und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2 mL Erythrozytenlysepuffer hinzugegeben und bei 600g für 7 min mit Beschleunigung und Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 3 mL Erythrozytenlysepuffer für 2 - 6 min inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (600 g, 7 min, mit Beschleunigung und Bremse) wurden die Zellen bei ausreichender Erythrozytenlyse in 1 mL HBSS aufgenommen. Wenn die Erythrozytenlyse nicht zufriedenstellend war, wurden die Zellen ein weiteres Mal in 1 mL Erythrozytenlysepuffer aufgenommen, erneut wie oben beschrieben zentrifugiert und danach in 1 mL HBSS aufgenommen. Die Färbung wurde wie in **Kapitel 2.2.4.6** durchgeführt mit dem Unterschied, dass das HBSS nicht mit autologem Serum supplementiert wurde.

Fluorochrom		Open Forum Infect Dis., 2020	J Fungi (Basel), 2021a			
		T-Zell Aktivierung	Zellpopulationen	T-Zell Aktivierung	Granulozyten Aktivierung	NK-Zell Aktivierung
VioBlue	Marker (Hersteller)	CD4 (MB)	CD3 (MB)	CD3 (MB)		
FITC	Marker (Hersteller)		CD66b (MB)	CD4 (MB)	CD66b (MB)	CD3 (BD)
PE	Marker (Hersteller)	IFN- γ (MB)		IFN- γ (MB)	CD62L (MB)	IFN- γ (MB)
PE-Vio615	Marker (Hersteller)			CD69 (MB)		CD69 (MB)
PerCP	Marker (Hersteller)		CD14 (MB)	CD8 (MB)		CD16 (MB)
PE-Vio770	Marker (Hersteller)			CD107a (MB)		CD107a (MB)
APC	Marker (Hersteller)	CD154 (MB)	CD56 (BD)	CD154 (MB)	CD11b (MB)	CD56 (BD)
APC-Vio750	Marker (Hersteller)		L/D fixable near-IR (I)	L/D fixable near-IR (I)	L/D fixable near-IR (I)	L/D fixable near-IR (I)

Tabelle 12: Antikörper für die VB-basierte Durchflusszytometrie. Antikörper für die Durchflusszytometrie der Veröffentlichung Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020 und Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021a). **Direkt nach dem Auftauen der Stimulationsröhrchen, vor dem Einspritzen des Bluts in die Stimulationsröhrchen hinzugefügt; Viabilitätsfärbung (L/D) durchgeführt vor der extrazellulären Färbung in 1 mL HBSS für 30 min; Extrazelluläre Färbung; Intrazelluläre Färbung;** Abkürzungen: Abkürzungen: APC = Allophycocyanin, BD = Becton Dickinson, BL = Biolegend, FITC = Fluorescein-5-isothiocyanat, I = Invitrogen, IR = Infrarot, MB = Miltenyi Biotec, PE = phycoerythrin, PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein, VB = Vollblut (übersetzt und adaptiert aus Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021a).

2.2.6 PBMC- und VB-basierte Methoden

2.2.6.1 MILLIPLEX Multiplex Assays mittels Luminex-Technologie

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Mycoses 2018

PBMCs wurden, wie oben beschrieben (siehe **Kapitel 2.2.4.2**), isoliert und danach, wie in **Kapitel 2.2.4.5** dargestellt, stimuliert. Hierbei wurde jedoch kein Brefeldin A hinzugefügt. Die PBMCs wurden 120 Std. bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und bis zur Analyse bei -80 °C kryopräserviert. Das Serum wurde, wie in **Kapitel 2.2.4.1** beschrieben, gewonnen.

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Mycoses 2018	Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021a
Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021b	

Das Serum oder der Zellkulturüberstand wurden 1:2 mit RPMI verdünnt. Die *Bead*-basierten Luminex-Assays MILLIPLEX HCYTOMAG 14-plex und MILLIPLEX MAP Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel Kit wurden von Mariola Dragan aus der Gruppe von Prof. Dr. Nicolas Schlegel (Universitätsklinikum Würzburg, Oberarzt für Viszeralchirurgie) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Zum Auslesen der Platten wurde der Luminex200 Leser in Verbindung mit der XPONENT3 Software und der Milliplex Analyse Software benutzt. Die finalen Konzentrationsberechnungen wurden in Microsoft Excel ausgeführt.

2.2.7 Statistik

Zytokinkonzentrationen bzw. Frequenzen von Aktivierungsmarker-positiven Zellen in den unstimulierten Kontrollproben wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Werten der stimulierten Proben substrahiert.

2.2.7.1 Signifikanzprüfung

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Mycoses 2018	Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020
Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021a	Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021b

Zur Signifikanzprüfung wurden, abhängig vom Datenformat, die folgenden Testverfahren verwendet: Mann-Whitney-U-Test, gepaarter, zweiseitiger t-Test, der Friedman-Test und *Dunn's multiple comparison*-Test. Die verwendeten Testverfahren sind in den Abbildungslegenden der jeweiligen Publikationen aufgeführt. Für die Korrektur der Falschentdeckungsrate (FDR) wurde in bestimmten Berechnungen die Benjamini-Hochberg Korrektur von 0.2 an den Mann-Whitney-U-Test angeschlossen. Korrelationsanalysen wurden mit Hilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten (r) oder der Spearman-Rangkorrelation getätigt.

2.2.7.2 Bestimmung von technischen Variationsparametern

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Mycoses 2018

Der Variationskoeffizient (VK) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$VK(\%) = \sqrt{n}$$

n = Anzahl der *Aspergillus*-reaktiven Spots gemessen im ELISPOT oder der *Aspergillus*-reaktiven T-Zellen in der Durchflusszytometrie

Berechnung der Standardabweichung (SD) für die verschiedenen Assays:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}{n - 1}}$$

n = Anzahl der Events; x_i = Ergebnis der einzelnen Messung; μ = Mittelwert der Messungen

Die SD der unspezifischen Hintergrundmessung und der antigenspezifischen Assay-Ergebnisse wurde gemäß dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz kombiniert und berechnet:

$$SD_{Ges} = \sqrt{(SD_{uns}^2) + (SD_{stim}^2)}$$

uns = unspezifische Hintergrundmessung; stim = stimulierte Probe

Der reale VK (VK_R) wurde wie folgt berechnet:

$$VK_R = \sqrt{\frac{SD_{Ges}}{Diff}}$$

Diff = Differenz der Zytokinkonzentrationen bzw. antigenspezifischen Zellfrequenzen zwischen stimulierter und unspezifischer Hintergrundmessung

Die erwartete SD (SD_E) wurde wie folgt berechnet:

$$SD_E = \sqrt{\left(\frac{\mu_{1+2}}{\sqrt{x_1 + x_2}}\right)^2 + \left(\frac{\mu_{3+4}}{\sqrt{x_3 + x_4}}\right)^2}$$

x = Ergebnis der einzelnen Messung; μ = Mittelwert der Messungen

Der erwartete VK (VK_E) wurde wie folgt berechnet:

$$VK_E = \sqrt{\frac{SD_E}{Diff}}$$

Diff = Differenz zwischen stimulierter und unspezifischer Hintergrundmessung

Das Konfidenzintervall (KI) wurde wie folgt berechnet:

$$KI = x \pm Z \times \frac{SD_E}{\sqrt{n}}$$

X = Mittelwert; Z = Standardfehler (z-Wert; z-Wert für das 95 % CI ist 1,96 und für das 99 % liegt der Wert bei 2,576), SD = Standardabweichung, n = Stichprobengröße

Testverfahren bei gelagerten oder kryokonservierten Proben wurden als nicht-unterlegen angesehen, wenn die Zytokinkonzentrationen oder spezifischen T-Zell-Frequenzen innerhalb des 95 % KI der sofort prozessierten Proben lagen.

Verwendet in:

Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021a

Die Zytokinkonzentrationen wurden auf das eingespritzte Blutvolumen normalisiert.

Die VK wurde wie folgt berechnet:

$$VK = \sqrt{\frac{SD}{\mu}}$$

μ = Mittelwert der Messungen

Wie in der Literatur vorgeschlagen [235], waren die Ziel-VKs für gut definierte Antigene 25 % (Aspf4) und für schlechter definierte Antigene 35 % (AfuLy).

2.2.7.3 Bestimmung der diagnostischen Leistung von Immun-Assays (ROC-Analyse)

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020
--

Die binäre Klassifikationseffizienz, bezogen auf den CMV-Serostatus und/oder eine CMV-Infektion, wurde mit der Grenzwertoptimierungskurve (ROC) bestimmt.

2.2.7.4 Random Forest-Analyse

Verwendet in:

Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021b
--

Die Random Forest Analyse wurde von Herrn Dr. Sascha Schäuble (Hans-Knöll Institut Jena) durchgeführt. Eine genauere Beschreibung der Analyse kann im Abschnitt 2.7. *Statistical Analyses* der Publikation Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021b gefunden werden.

2.2.7.5 Datenanalyse und Datenvisualisierung

Verwendet in:

Lauruschkat et al., Mycoses 2018	Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020
Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021a	Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021b

- Lauruschkat et al., Mycoses 2018

- Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020
- Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021a
- Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021b

Zur Datenanalyse und Visualisierung wurden die Programme GraphPad Prism, Microsoft Excel, sowie die im Materialteil spezifizierten Online-Ressourcen benutzt. Die zur Evaluation der Ergebnisse genutzten statistischen Tests sind unter den Abbildungen vermerkt. Signifikanzlevel wurden durch nicht signifikant (ns) $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ angegeben. In seltenen Fällen wurden, wie in den entsprechenden Abbildungslegenden spezifiziert, weitere Symbole zur Darstellung von Trends verwendet. Die Definition des Trends kann unter den entsprechenden Abbildungen gefunden werden.

3 Resultate

Der Resultatteil meiner kumulativen Dissertation wird aus den folgenden Publikationen gebildet:

- Susceptibility of *A. fumigatus*-specific T-cell assays to pre-analytic blood storage and PBMC cryopreservation greatly depends on readout platform and analytes. **Lauruschkat CD***, Wurster S*, Page L, Lazariotou M, Dragan M, Weis P, Ullmann AJ, Einsele H., Löffler J. *Mycoses*. 2018 Aug;61(8):549-560. doi: 10.1111/myc.12780. Epub 2018 Jun 11.
- Development of a simple and robust whole blood assay with dual co-stimulation to quantify the release of T-cellular signature cytokines in response to *Aspergillus* antigens. **Lauruschkat CD**, Page L, White PL, Etter S, Davies HE, Duckers J, Ebel F, Schnack E, Backx M, Dragan M, Schlegel N, Kniemeyer O, Brakhage AA, Einsele H., Loeffler J #, Wurster S#. *J Fungi (Basel)*. 2021 Jun 8;7(6):462. doi: 10.3390/jof7060462. (a)
- Chronic occupational mold exposure drives expansion of *Aspergillus*-reactive type 1 and type 2 T-helper cell responses. **Lauruschkat CD**, Etter S, Schnack E, Ebel F, Schäuble S, Page L, Rümens D, Dragan M, Schlegel N, Panagiotou G, Kniemeyer O, Brakhage AA, Einsele H., Wurster S#, Loeffler J #. *J Fungi (Basel)*. 2021 Aug 27;7(9):698. doi: 10.3390/jof7090698. (b) (Die experimentellen ELISPOT-Daten von Abbildung 4, 5 sowie die ELISPOT-Daten, die einen Teil von Abbildung 6 ausmachen, sowie die serologischen Daten, die im Artikel mit *data not shown* gezeigt wurden, wurden von Frau Sonja Etter generiert und werden als Teil Ihrer Dissertation in veränderter Form eingereicht.)
- T-Cell Immune Surveillance in Allogenic Stem Cell Transplant Recipients: Are Whole Blood-Based Assays Ready to Challenge ELISPOT?. **Lauruschkat CD***, Page L*, Etter S, Weis P, Gamon F, Kraus S, Einsele H., Wurster S#, Loeffler J#. *Open Forum Infect Dis*. 2020 Nov 8;8(1):ofaa547. doi: 10.1093/ofid/ofaa547. eCollection 2021 Jan.

* geteilte Erstautorenschaft, # geteilte Letztautorenschaft

Während der Dissertationszeit habe ich den folgenden Reviewartikel veröffentlicht (Appendix 6.1):

Immunomodulation as a Therapy for Aspergillus Infection: Current Status and Future Perspectives.

Lauruschkat CD, Einsele H., Loeffler J. *J Fungi* (Basel). 2018 Dec 14;4(4):137. doi: 10.3390/jof4040137. Review.

3.1 Kapitel 1: Susceptibility of *A. fumigatus*-specific T-cell assays to pre-analytic blood storage and PBMC cryopreservation greatly depends on readout platform and analytes.

Autorenliste:

Lauruschkat CD*, Wurster S*, Page L, Lazariotou M, Dragan M, Weis P, Ullmann AJ, Einsele H., Löffler.

* geteilte Erstautorenschaft

Journal:

J. Mycoses (ISSN: 1439-0507)



Ausgabe:

2018 Aug;61(8):549-560

Doi:

<https://doi.org/10.1111/myc.12780>

Sekundäre Veröffentlichung:

Die sekundäre Veröffentlichung findet mit der Genehmigung des Journals statt:

"If you are the author of a published Wiley article, you have the right to reuse the full text of your published article as part of your thesis or dissertation. In this situation, you do not need to request permission from Wiley for this use." [236]

Susceptibility of *A. fumigatus*-specific T-cell assays to pre-analytic blood storage and PBMC cryopreservation greatly depends on readout platform and analytes

Chris D. Lauruschkat¹ | Sebastian Wurster¹  | Lukas Page¹ | Maria Lazariotou¹ | Mariola Dragan² | Philipp Weis¹ | Andrew J. Ullmann¹ | Hermann Einsele¹ | Jürgen Löffler¹

¹Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine II, University Hospital of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany

²Department of Surgery I, University Hospital of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany

Correspondence

Jürgen Löffler, University Hospital of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany.
Email: Loeffler_J@ukw.de

Funding information

Interdisciplinary Centre for Clinical Research (IZKF) Wuerzburg, Grant/Award Number: Z-3/56; Bavarian Ministry of Economics, Media, Energy and Technology, Grant/Award Number: BayBIO-1606-003

Summary

Mould-specific T cells detectable by flow cytometry or ELISPOT were proposed as a novel biomarker in invasive aspergillosis. To define protocols facilitating sample shipment and longitudinal analysis, this study evaluated the susceptibility of different functional assays for *A. fumigatus*-specific T-cell quantification and characterisation to pre-analytic delays. PBMCs from 6 healthy donors were analysed after immediate isolation, after 6 hours whole blood storage or after cryopreservation using 3 different common media. Functional responses to *A. fumigatus* lysate stimulation were comparatively assessed by flow cytometry, ELISPOT and 14-plex cytokine assay. After 6 hours pre-analytic storage, all functional assays showed reduced detection rates, higher coefficients of variation (CV) and widely varying individual recovery indices of specific T-cell response. While cryopreservation resulted in sufficient yields and largely unaltered cellular composition, outcomes of functional readouts significantly differed from freshly processed samples. For CD154-based flow cytometry, only cryopreservation in RPMI supplemented with autologous serum resulted in satisfactory detection rates and CVs. For ELISPOT and cytokine secretion assays, none of the cryopreservation protocols provided sufficient concordance with immediately processed samples. Even using the same readout platform, individual analytes widely varied in their susceptibility to cryopreservation, highlighting that distinct optimisation is required depending on the downstream assay.

KEYWORDS

Aspergillus fumigatus, cryopreservation, cytokines, ELISPOT, flow cytometry, immunoassay

1 | INTRODUCTION

Functional T-cell assays are broadly applied to analyse cellular immunity for scientific and diagnostic purposes including the diagnosis of tuberculosis or vaccine trials.^{1,2} The most commonly employed

methods for the detection and phenotyping of antigen-specific T cells are flow cytometry, enzyme-linked immunospot (ELISPOT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Several recent studies in medical mycology took advantage of these technologies to assess T-cell responses to mould or yeast antigens in patients with invasive mycoses,³⁻⁷ in the field of environmental health^{8,9} or in the development of immune therapeutic protocols.^{10,11}

Chris D. Lauruschkat and Sebastian Wurster contributed equally to this work.

Of particular interest for diagnostic mycology is the description of antigen-specific T cells detectable by flow cytometry³ or ELISPOT⁵ as a novel biomarker in invasive aspergillosis, the most frequent opportunistic mould infection causing significant morbidity and mortality in immunocompromised patients. Early and reliable diagnosis of invasive aspergillosis remains challenging, however, essential in order to improve therapeutic outcomes.^{12,13} Specific T-cell assays were reported to provide high sensitivity and specificity^{3,5} and may contribute to distinguish the causative pathogen and to monitor therapeutic responses.³

To facilitate prospective multi-centric validation of functional T-cell readouts in medical mycology, a variety of both patient-related factors and technical parameters determining assay performance need to be studied.¹⁴ Previous reports particularly established that pre-analytic sample storage may greatly influence functional T-cell assays and, thus, complicate sample shipment to remote laboratories.¹⁵⁻¹⁷ Moreover, cryopreservation protocols including the thawing and resting process need to be optimised and standardised¹⁸⁻²² to allow for batch analysis of stored patient samples, thereby reducing inter- and intra-laboratory variability²³ and costs.

Compared with other applications of functional T-cell assays in infectious diseases, protocol standardisation for mould-specific T-cell quantification and characterisation poses specific challenges. T_H2 and T_H17 polarised cells significantly contribute to the diagnostically accessible mould reactive T-cell repertoire in patients with invasive mycoses.^{5,6} As of yet, however, few studies addressed sample storage and cryopreservation protocols for cytokine readouts other than IFN- γ , underlining the need for broader evaluation to determine the most robust readout methods and analytes for mould reactive T-cell assays using stored or thawed samples. Protocol optimisation is further complicated by considerable baseline frequencies of mould reactive T cells in non-infected subjects due to environmental exposure to airborne mould spores.^{5,9,24} Hence, precise quantitative values instead of dichotomous results (positive/negative) are required for diagnostic applications and even minor impairment of assay performance by pre-analytic storage or cryopreservation may hamper clinical usability of the protocols.

This study, therefore, aimed to comparatively analyse the impact of pre-analytic blood storage and cryopreservation on *Aspergillus fumigatus*-specific T-cell quantification and characterisation of their cytokine signatures by flow cytometry, ELISPOT and magnetic bead-based multiplex cytokine assay. As alterations in T-cell functionality due to the use of different cryopreservation media is a major concern and diversely discussed in the literature,¹⁸⁻²¹ 3 common and cost-effective freezing media^{15,18-21,25} were compared (trial flow-chart provided in Figure 1).

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Subjects

After obtaining written consent approved by the ethics committee of the University of Wuerzburg, 150 ml Li-Heparin blood and

15 ml serum were drawn from healthy adult donors. Subjects were screened for absence of acute or chronic infectious diseases, diabetes mellitus, pregnancy, immunosuppressive therapy or recent vaccinations.

2.2 | PBMC isolation

Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation was performed using Leucosep™ separation tubes and ficoll. For cell counting, PBMCs were diluted in HBSS, counted and subsequently divided into portions for surface marker analysis (8×10^5), ELISPOT (4×10^6) and intracellular staining & multiplex cytokine assays (1×10^7). Remaining cells were equally distributed among 3 cryopreservation protocols ($3.0-5.5 \times 10^7$ per condition, depending on individual yield). After a washing step (400 g, 10 min), cells were suspended in the appropriate media (Supplementary Table S1) for flow cytometry & multiplex cytokine assays (RPMI + 5% autologous serum), ELISPOT (AIM-V AlbuMAX™; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) or cryopreservation (details below).

2.3 | Cryopreservation of PBMCs

Upon counting and washing, cells were suspended in RPMI + 40% FCS, RPMI + 20% autologous serum or AIM-V at a concentration of 1×10^7 cells per 900 μ l. A cell loss factor (15.4%) accounting for losses due to washing (before cryopreservation) and counting (after cryopreservation) was determined in a preceding experiment and added to the cell number frozen per aliquot. Ten per cent DMSO was added immediately before freezing to obtain a final concentration of 1×10^7 per ml. One millilitre aliquots were prepared in CryoTube™ vials (Thermo Fisher Scientific) and frozen at -80°C in a Mr. Frosty™ freezing container (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA). After 72-96 hours, cells were transferred to liquid nitrogen and stored for 2-4 weeks.

2.4 | Thawing and resting of PBMCs

Pre-warmed thawing medium (1 ml, 37°C , Supplementary Table S1) was added dropwise to each vial and the suspension was transferred dropwise to 20 ml of the same medium. Vials were rinsed twice with thawing medium. After centrifugation for 10 min at 400 g, supernatants were discarded and cells were washed in 20 ml pre-warmed medium (RPMI or AIM-V, Supplementary Table S1), followed by another centrifugation step (10 min, 400 g). Cells were suspended in 300 μ l HBSS for counting and 8×10^5 cells were removed for surface staining. Remaining cells were diluted in resting medium (Supplementary Table S1) at a concentration of 5×10^6 cells per ml. Cells were rested (37°C , 5% CO_2) for 16-18 hours in a T25 cell culture flask at a slant of 5° as recommended in the literature.²⁶ After resting, cells were transferred to a 50 ml centrifugation tube and culture flasks were washed with 10 ml RPMI or AIM-V. Cells were centrifuged (10 min, 400 g), diluted in 300 μ l HBSS, quantified and divided into portions for surface marker analysis (8×10^5), ELISPOT (4×10^6) and intracellular staining & multiplex cytokine assays (1×10^7).

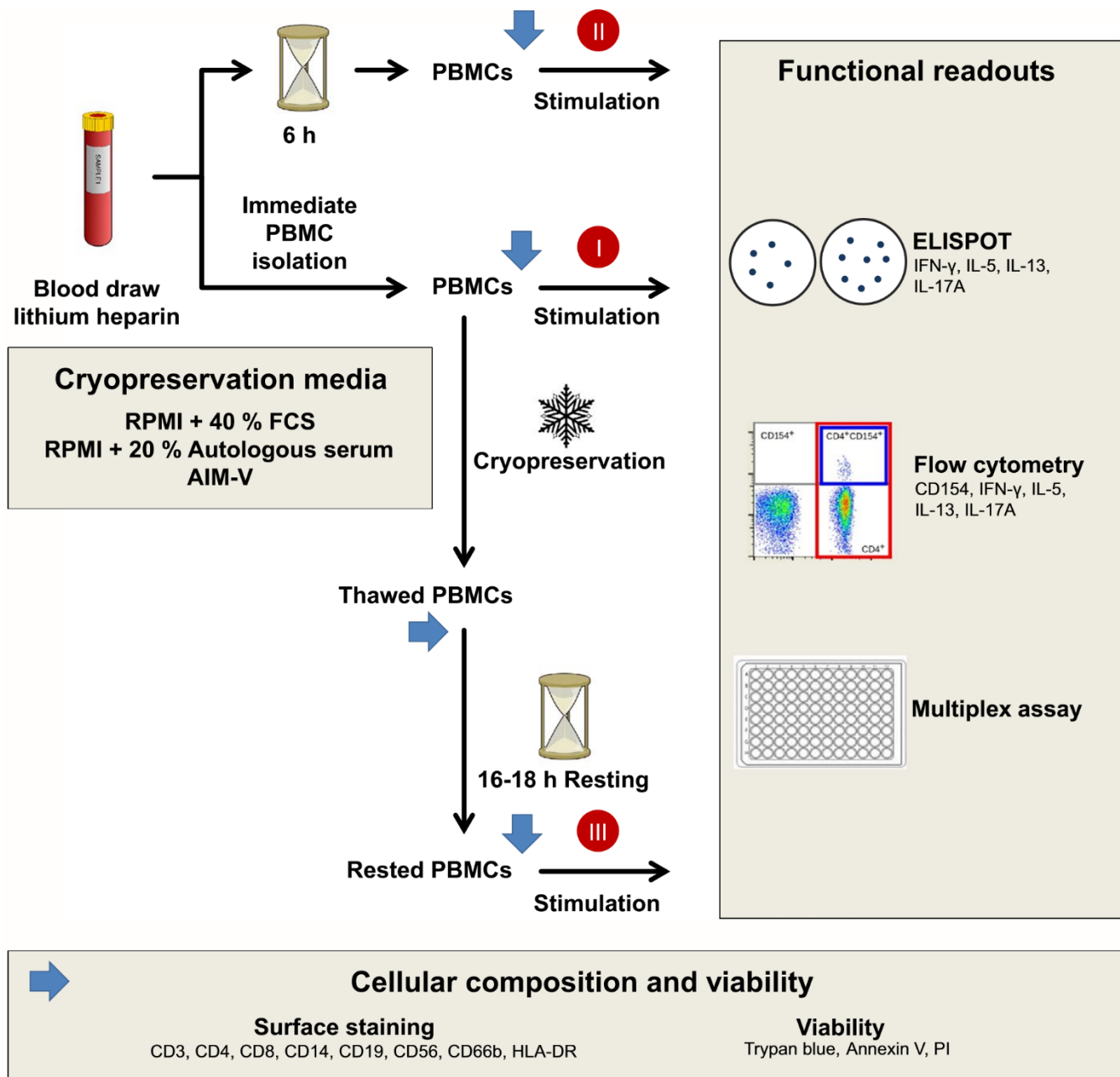


FIGURE 1 Overview of experimental procedures. PBMCs were isolated from heparinised whole blood of 6 healthy adult subjects. Functional readouts were comparatively performed using immediately isolated PBMCs (I), cells isolated after 6 h whole blood storage (II, simulating delays due to sample shipment to remote laboratories), and cryopreserved PBMCs (III) using 3 different freezing media. A resting step was introduced after thawing as recommended in the literature.²⁶ Blue arrows indicate sampling for cellular composition and viability analyses

2.5 | Cellular composition and viability

After isolation, cryopreservation and resting, cell viability was determined by trypan blue exclusion. Leucocyte composition was characterised by flow cytometry (FACS Calibur; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) after α -CD3-FITC, α -HLA-DR-PE, α -CD14-PerCP, α -CD56-APC, α -CD4-FITC, α -CD66b-PE, α -CD8-PerCP and α -CD19-APC (BD Biosciences; BioLegend, San Diego, CA, USA; and Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) surface staining. Viability

of lymphocytes was assessed using APC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences), α -CD3-FITC and propidium iodide.

2.6 | Flow cytometric quantification of *A. fumigatus*-specific T cells

Peripheral blood mononuclear cells were diluted in RPMI 1640 containing 5% autologous serum at a final concentration of 1×10^7 cells per ml. 1×10^6 cells (100 μ l) were seeded per well of a 96-well flat

bottom plate; 5 µg of *A. fumigatus* mycelial lysate and 0.1 µg α-CD28 costimulatory antibody (both from Miltenyi Biotec) were added for cell stimulation. To determine unspecific background, control samples were treated with α-CD28 only. Cell stimulation was performed for 18–20 h at 37°C, 5% CO₂. After 2 h of incubation, brefeldin A was added at a final concentration of 10 µg/ml. Cells were stained extracellularly with α-CD4-VIT4-FITC and α-CD3-PerCP. Intracellular CD154 (α-CD154-APC; Miltenyi Biotec) and cytokine staining (α-IFNG-PE, α-IL-5-PE, α-IL-13-PE or α-IL-17A-PE; Miltenyi Biotec) were performed using the Inside Stain Kit (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. From each sample, 1 × 10⁵ lymphocytes were acquired on a FACS Calibur cytometer. The study was conducted in accordance with MIATA requirements.²⁷ Experimental details and relevant raw data are summarised in Supplementary Tables S2A,B.

2.7 | ELISPOT

IFN-γ, IL-5, IL-13 and IL-17A ELISPOT analysis was conducted according to the instructions of the manufacturer (Lophius Bioscience, Regensburg, Germany). 1 µg/ml α-CD28 and 1 µg/ml α-CD49d costimulatory antibody (both Miltenyi Biotec) were used for IFN-γ and IL-5 ELISPOT, and 1 µg/ml α-CD28 and 1 µg/ml α-CD40 costimulatory antibody (Miltenyi Biotec) for IL-13 ELISPOT. Stimulation was performed with 7.5 µg *A. fumigatus* Lysate (Miltenyi Biotec) or 6 µg Phytohaemagglutinin (Lophius Bioscience). Costimulatory antibodies and stimuli were diluted to a volume of 50 µl per well in AIM-V AlbuMAX™ (Thermo Fisher Scientific). PBMCs were suspended in AIM-V AlbuMAX™ at a final concentration of 2 × 10⁶ cells per ml and 2 × 10⁵ cells in 100 µl were added to each well. Incubation times were 24 ± 2 h for IFN-γ, and 40 ± 2 h for IL-5, IL-13 and IL-17. Ideal costimulatory cocktails and stimulation periods were determined for each analyte in preceding experiments. IFN-γ was detected using a 1-step detection antibody and IL-5, 13, 17A were detected using a 2-step detection system according to Lophius Bioscience's instructions. Plates were analysed on a Bioreader 5000a (BioSYS, Karben, Germany) using the Bioreader 12.1 software. ELISPOT-specific reporting according to MIATA requirements is provided in Supplementary Table S2C.

2.8 | Multiplex cytokine assays

Peripheral blood mononuclear cells were isolated and stimulated as described for flow cytometric analysis, but not treated with brefeldin A. Cells were incubated for 120 hours at 37°C, 5% CO₂. Cytokine secretion into the culture supernatant was analysed using a 14-plex HCYTOMAG Milliplex Kit (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Quality control samples provided by the manufacturer were used to validate proper assay performance.

2.9 | Statistical analysis

Unless otherwise stated, 6 samples were assessed for each time point and readout. Coefficients of variation (CV) for each measurement

were calculated according to the formula $CV (\%) = n^{0.5} (n = \text{total antigen reactive spot count or acquired antigen reactive T cells in flow cytometry})$.²⁸ Standard deviations (SD) of unspecific background and antigen reactive test results were combined using the formula $\text{Total SD} = (\text{SD}_{\text{unspecific}}^2 + \text{SD}_{\text{antigen-reactive}}^2)^{0.5}$ (Gaussian error propagation), and the total SD was divided by the antigen-specific T-cell frequencies (after deduction of unspecific background) to obtain the total expected CV. The standard deviation of replicate measurements (ELISPOT: 2 wells per sample and stimulus, CD154 flow cytometry: 4 wells per stimulus) was divided by the specific T-cell frequency (after deduction of unspecific background) to calculate the real CV. Stored or cryopreserved samples were considered non-inferior if specific T-cell levels of at least 5 of 6 donors were within the respective 95% confidence interval of immediately processed samples.

3 | RESULTS

3.1 | Pre-analytic storage or cryopreservation in 3 different freezing media results in high yields, viability and comparable cell composition

After cryopreservation of PBMCs with 3 different media, cell loss, cell composition and viability were assessed before and after resting. Both serum-supplemented cryopreservation media resulted in similar yields after thawing and resting (total cell loss: 36.2% and 36.6%, respectively). Cryopreservation in serum-free AIM-V medium led to lower yields (total cell loss: 44.0%) due to greater cell loss immediately after thawing, whereas slightly lower cell loss occurred during resting (Figure 2).

While granulocyte contamination of isolated PBMCs significantly inclined in pre-analytically stored samples compared to immediately isolated PBMCs (4.5% vs 0.2%), granulocyte content after cryopreservation and resting was comparable to immediately processed PBMCs (Supplementary Figure S1A). Lymphocyte composition after 6 h pre-analytic storage or cryopreservation remained largely unaltered (Figure 3). Slightly reduced CD4⁺/CD8⁺ ratio was observed after cryopreservation in RPMI + FCS, but recovered during resting period (Supplementary Figure S1B).

Lymphocyte viability of minimum 98.5% was observed for all studied conditions and reached an average of 99.7% in immediately processed samples (Supplementary Figure S2). Using serum-supplemented cryopreservation media, resting of cells after thawing contributed to the elimination of dead cells, indicated by a 0.9% (RPMI + FCS) and 0.7% (RPMI + autologous serum) incline of vital lymphocytes.

3.2 | Selection of cryopreservation media greatly influences the accuracy of *A. fumigatus*-specific T-cell quantification by CD154 upregulation or intracellular cytokine staining (ICS)

Reliable flow cytometric detection of CD154⁺/CD4⁺ *A. fumigatus*-specific T cells was observed using immediately isolated PBMCs, with

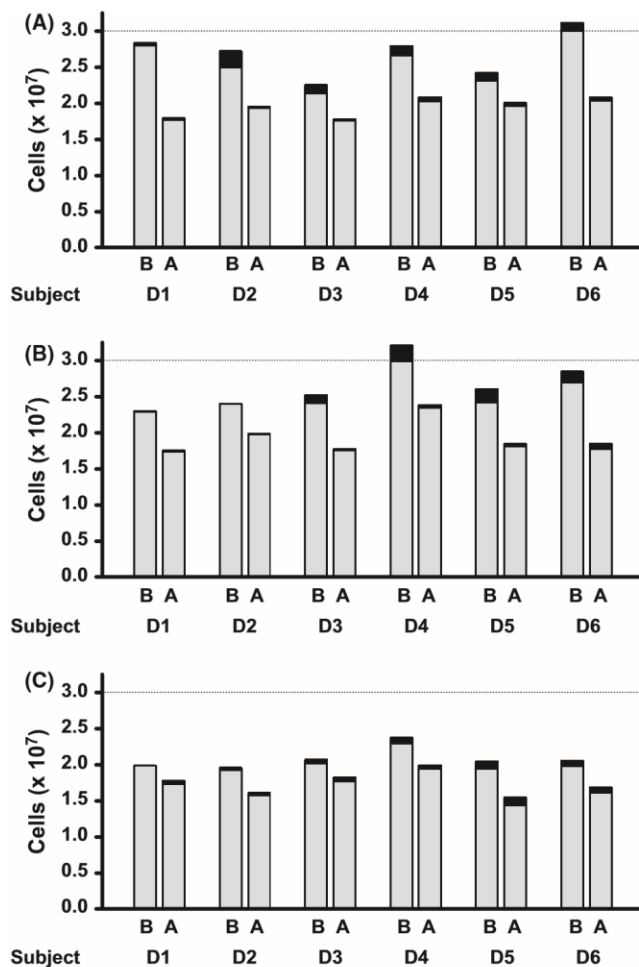


FIGURE 2 Yields and viability of thawed cells before and after resting. Three million PBMCs were cryopreserved using RPMI + 40% FCS + 10% DMSO (A), RPMI + 20% autologous serum + 10% DMSO (B) or AIM-V + 10% DMSO (C). Thawing, washing and cell quantification were performed as described above. Viability was determined by trypan blue exclusion. Yields of vital (grey part of the column) and dead (black part of the column) cells after thawing (left column) and resting (right column) are shown in the diagram. Individual values of 6 donors before [B] and after resting [A] are provided

a median CV of 8.0% (Figure 4A,C). While an average of 12.8% of the CD154⁺ cells expressed IFN- γ ⁺, few IL-5⁺, IL-13⁺ and IL-17⁺ cells were detected after overnight stimulation of freshly isolated PBMCs (Supplementary Table S3). Quantifying *A. fumigatus*-specific CD154⁺/CD4⁺ cells after 6 h pre-analytic storage, detection rates in 5 of 6 samples missed the 95% CI of immediately processed cells (Figure 4A), partly due to significantly increased unspecific background (Supplementary Figure S3, exemplary data set in Supplementary Figure S4). For CD154⁺IFN- γ ⁺/CD4⁺ frequencies, 2 significant deviations were observed after pre-analytic blood storage (Figure 4B).

Cryopreservation in RPMI + FCS or AIM-V resulted in widely varying recovery rates of specific T cells detectable by CD154⁺ upregulation or ICS, aggravated by poor correlation with results obtained using immediately processed cells and high unspecific background

(Supplementary Figure S3, Supplementary Table S3). Freezing cells in RPMI supplemented with autologous serum, all CD154⁺/CD4⁺ detection rates exceeded the upper limit of 95% CVs of freshly analysed samples but resulted in excellent correlation with immediately processed samples ($r = 0.98$). Therefore, remaining PBMCs from 4 donors were thawed (no backup vials were available for D1 and D3) and stimulated without cell resting, resulting in nearly exact recovery of specific T-cell detection rates of immediately processed cells (Supplementary Figure S5A and S6). For combination of CD154 and IFN- γ intracellular staining, all studied cryopreservation conditions led to violations of the 95% CI of freshly isolated cells in at least 2 of 6 donors, whereas median recovery rates (0.72-1.40) and correlation with immediately processed samples (0.58-0.83) were largely acceptable (Supplementary Table S3, Supplementary Figure S5B).

To evaluate the precision of CD154-based *A. fumigatus*-specific T-cell detection depending on pre-analytic sample treatment, expected and real CVs were compared (Figure 4C). For both pre-analytically stored and cryopreserved samples, real CVs significantly exceeded the statistically expected range. Particularly strong impairment of assay precision was observed using pre-analytically stored blood samples.

3.3 | Pre-analytic storage and cryopreservation significantly impair reliability of ELISPOT-based *A. fumigatus*-specific T-cell detection

A. fumigatus-specific IFN- γ , IL-5, IL-13 and IL-17 producing spot forming cells (SFCs) were quantified by ELISPOT. Pre-analytic storage led to strongly reduced counts of IL-5, IL-13 and IL-17 SFCs compared with immediately processed cells. Up to 4 (IL-5 and IL-13) of 6 test results missed the 95% CI of immediately processed samples (Figure 5, Supplementary Table S4) and assay precision was markedly reduced, indicated by elevated CVs of replicate wells (representative data shown in Supplementary Figure S7).

All studied cryopreservation protocols resulted in at least 3 deviations per cytokine exceeding 95% the CI of SFC counts observed in freshly processed samples (Figure 5, Supplementary Table S4). Alarming, in several samples, the number of specific SFCs decreased to zero after cryopreservation (Supplementary Figure S8). Particularly poor performance was observed for IL-17 ELISPOT, with 5/6 out-of-range values for each cryopreservation protocol and 11 out of 18 samples without detectable specific response in thawed samples. Despite of elevated unspecific background (except for IL-17), cryopreservation in RPMI + FCS showed the relatively best recovery rates of SFCs and correlation with freshly processed samples.

3.4 | Highly variable inter-individual susceptibility of PBMCs to storage and cryopreservation complicates establishment of robust protocols for cytokine secretion assays

A multiplex assay was used to measure cytokine levels in supernatants of *A. fumigatus* lysate stimulated PBMCs. Although after pre-analytic

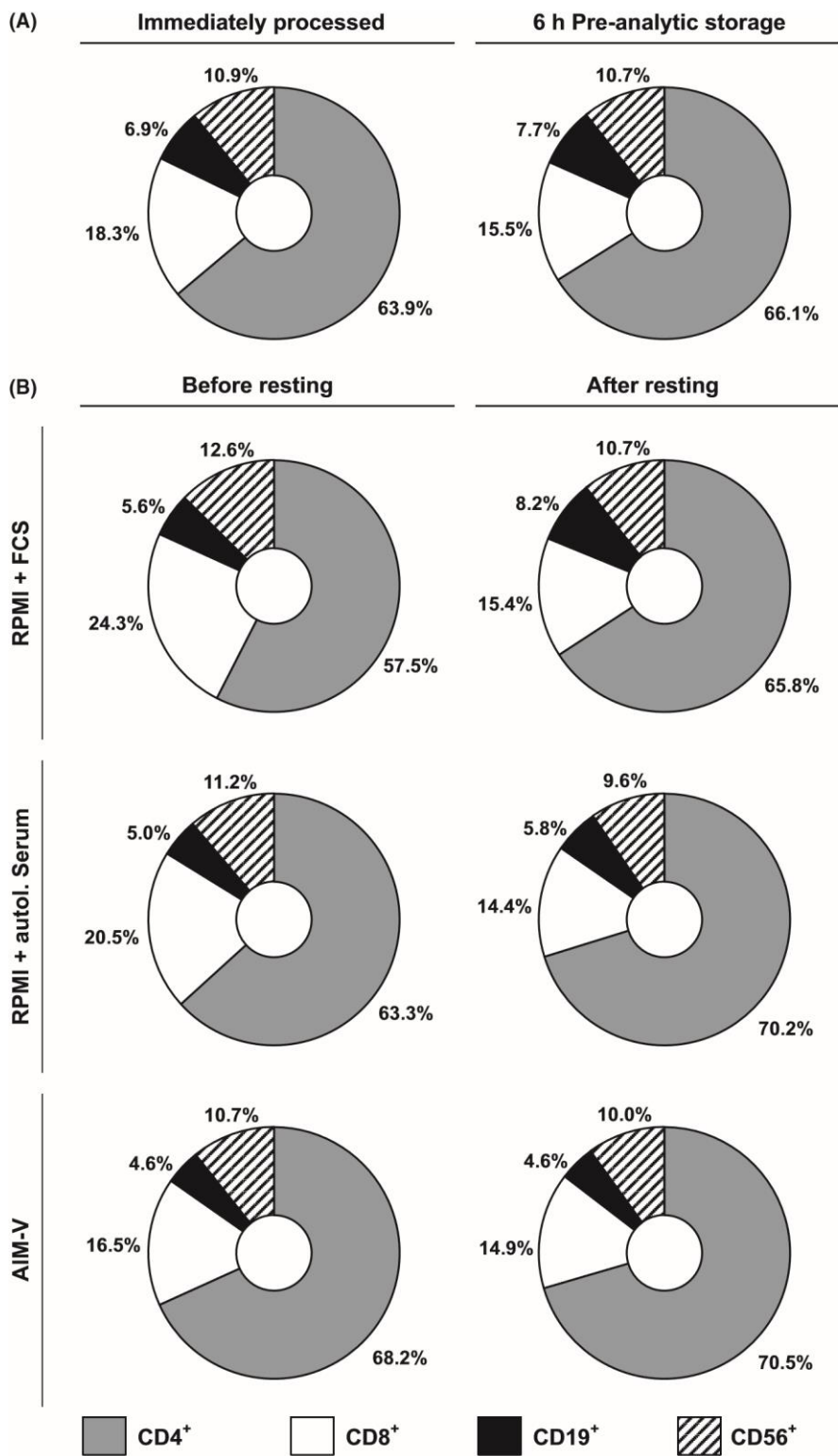


FIGURE 3 Composition of the lymphocyte population in fresh, stored, thawed and rested samples. CD4, CD8, CD19 and CD56-positive cells were quantified among the lymphocyte population of isolated PBMCs. Mean values of 6 subjects are shown in the figure. (A) Comparison of immediately isolated PBMCs and PBMCs obtained from blood samples stored at room temperature for 6 h prior to isolation. (B) Analysis of cells cryopreserved using 3 different media. Thawed samples were comparatively assessed before and after overnight resting

blood storage mean concentrations of all cytokines except IL-10 and IL-17 remained within a 2-fold range of immediately processed cells (Supplementary Table S5), inter-individual susceptibility greatly differed. For IL-2, IL-8, IL-10 and IL-17 concentrations, individual fold changes even ranged from below 0.1 to more than 10 (Figure 6).

Using RPMI + autologous serum or AIM-V, there was no evidence of generally reduced release by thawed cells for the majority of studied

cytokines; however, wide inter-individual variation of fold changes and poor coefficients of correlation were observed (Supplementary Table S5). Considering absolute concentrations, inter-individual variation of fold changes, and coefficients of correlation, cytokines significantly differed in relatively better robustness to cryopreservation in RPMI + autologous serum (IL-5, IL-6, IL-8) or AIM-V (IL-17). For IFN- γ , TNF- α , IL-2 and IL-10, neither of the cryopreservation protocols showed convincing

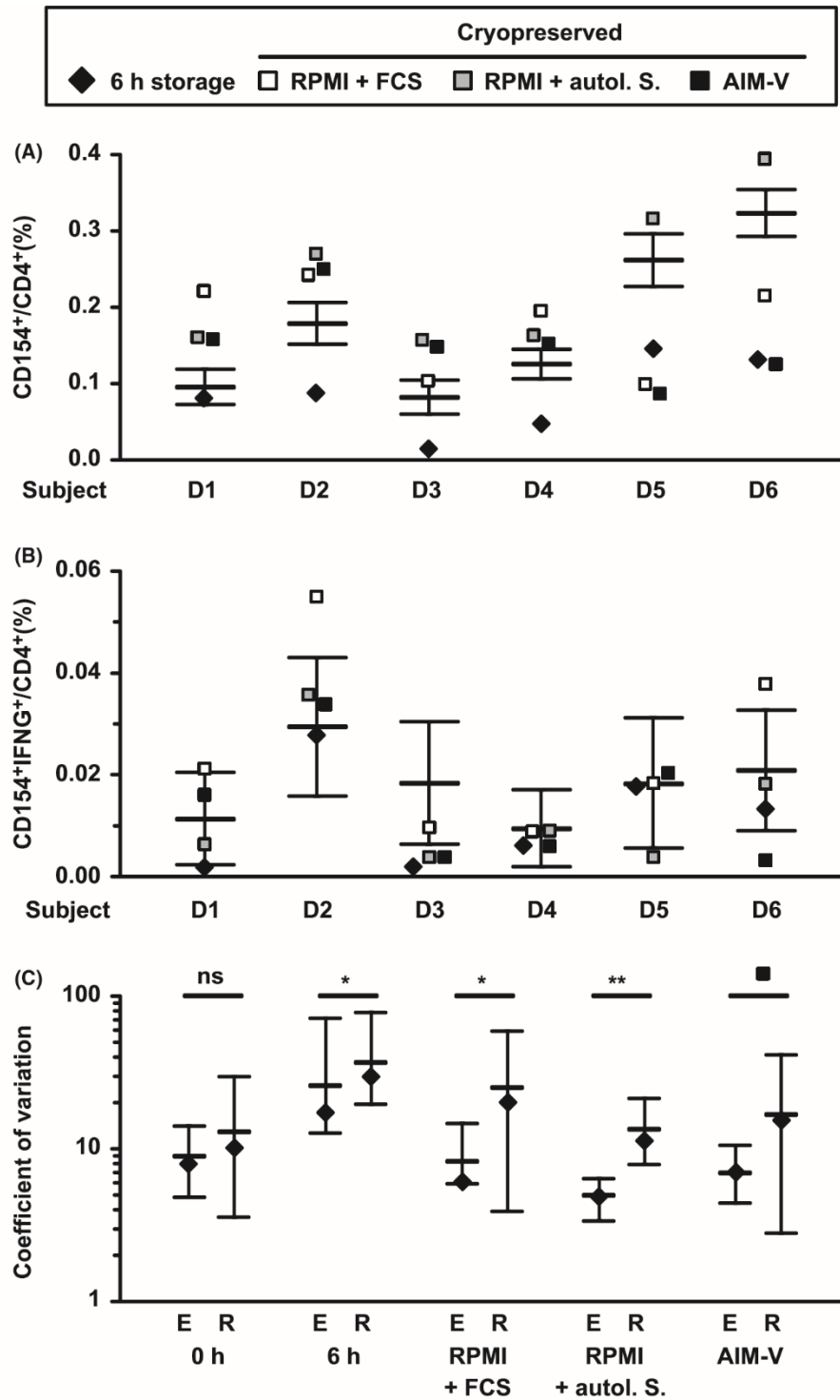


FIGURE 4 Quantification of mould-specific T cells by flow cytometry. A. *fumigatus*-specific T cells were quantified by intracellular CD154 and IFN- γ staining after stimulation of PBMCs with α -CD28 \pm *A. fumigatus* mycelial lysates, addition of brefeldin A, and overnight culture as described in the Methods section. (A and B) CD154⁺/CD4⁺ (A) and CD154⁺IFN- γ ⁺/CD4⁺ (B) *A. fumigatus*-reactive T-cell frequencies of 6 donors are shown. Whiskers indicate 95% confidence intervals of test results obtained using immediately processed samples. (C) Expected [E] and real [R] coefficients of variation for CD154⁺/CD4⁺ T-cell frequencies were calculated as described above. Mean (thick horizontal lines), median (black diamonds), minimum and maximum (whiskers) coefficients of variation (n = 6) are given. Significance testing was performed using paired 2-sided *t*-test. ■ *P* < .1, **P* < .05, ***P* < .01

performance (Figure 6, Supplementary Table S5). Cryopreservation in RPMI + FCS led to highly decreased lysate-specific secretion of most cytokines due to high unspecific background levels (Figure 6). Multiple

cases of gained or completely lost specific cytokine secretion in response to the lysate were found after pre-analytic storage or cryopreservation (Supplementary Figure S9).

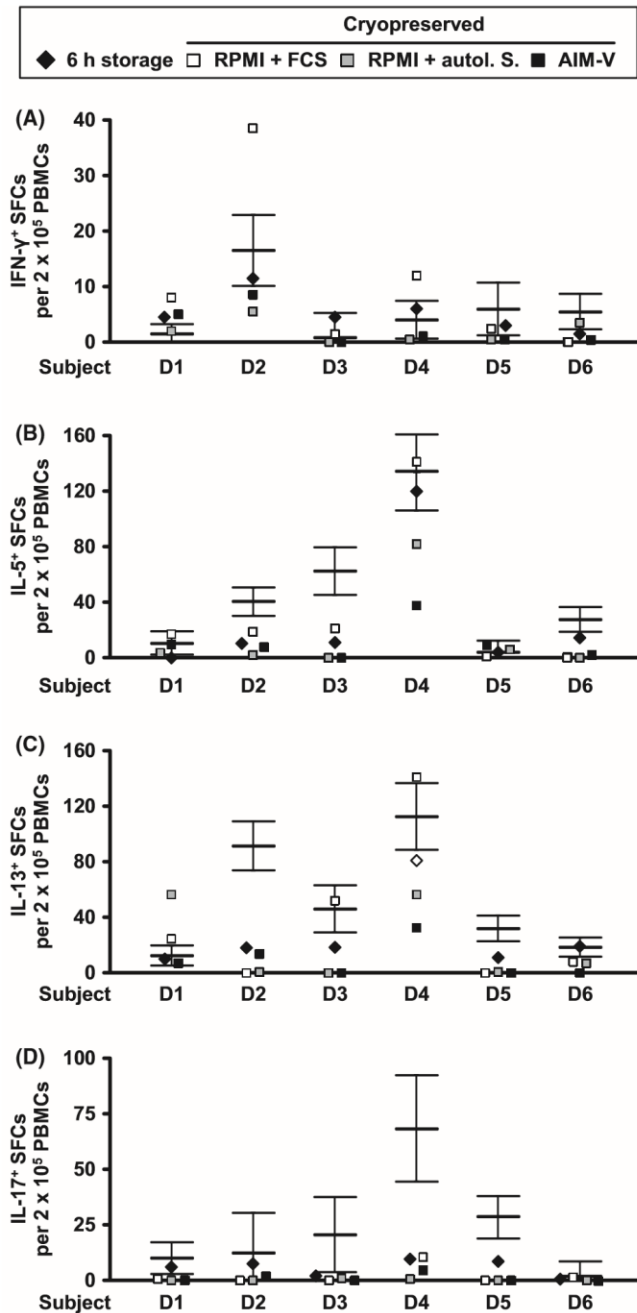


FIGURE 5 Analysis of cytokine secretion by ELISPOT. A. *fumigatus*-specific T cells were quantified by IFN- γ (A), IL-5 (B), IL-13 (C) and IL-17 (D) ELISPOT as described in the Methods section. Individual SFC counts per 200 000 stimulated PBMCs after deduction of unspecific background are shown in the figure. Whiskers indicate 95% confidence intervals of test results obtained using immediately processed samples

4 | DISCUSSION

Functional T-cell assays greatly contribute to the understanding of adaptive immunity in infectious diseases. Recently, antigen-reactive T-cell monitoring by flow cytometry or ELISPOT was proposed as a supportive biomarker to monitor invasive mycoses.³⁻⁶ Use of freshly isolated cells remains the gold standard for PBMC-based T-cell

assays, but delayed sample processing is often unavoidable in the clinical routine. Moreover, in multi-centre studies such as the evaluation of immune therapeutic approaches,¹¹ freezing and shipment of isolated cells become indispensable and pose significant challenges for assay standardisation.¹⁴ The present study, therefore, compared the performance of *A. fumigatus*-specific T-cell quantification by flow cytometry and ELISPOT using fresh, stored (6 h) and cryopreserved samples, complemented by analyses of cellular composition, viability and cytokine patterns released by stimulated PBMCs.

CD154-based flow cytometry using immediately isolated PBMCs resulted in excellent reproducibility of detection rates with intra-assay coefficients of variation consistently below 15%. IFN- γ ⁺/CD154⁺ detection rates of 7%-20% and even lower numbers of IL-5⁺ and IL-17⁺ cells were in line with a previous report on flow cytometric characterisation of specific T cells after short-term stimulation with a crude mycelial lysate.²⁹ However, stimulation schemes were optimised for CD154 detection, while some of the additional cytokine markers—selected on the basis of previously observed enhanced secretion in subjects with intensive mould exposure³⁰—exhibit rather protracted expression.³¹ As stimulation periods for ELISPOT-based protocols employed in this study were optimised individually for each cytokine and could be selected independently of other markers, considerably higher ELISPOT-based detection rates of these cytokines were not surprising.

While broad consensus exists that prolonged pre-analytic blood storage hampers functional T-cell assays,^{14,32,33} several studies also discuss an impact of 4- to 6-hour delays^{20,34} and improvement of assay performance upon implementation of an immediate sample processing policy has been reported.^{17,34} For both intracellular staining and ELISPOT, our data document strikingly reduced response to *A. fumigatus* mycelial lysate stimulation if samples were stored for 6 hours prior to cell isolation. Though the impact of pre-analytic storage on CD154-based-specific T-cell detection was less pronounced compared with our previously published data,¹⁵ possibly due to lithium heparin anticoagulation instead of EDTA,³² detection rates and precision were affected to a degree preventing reasonable clinical applicability of the test. While the interpretability of IFN- γ was limited due to low SFC numbers in immediately processed samples resulting in broad confidence intervals, all cytokines studied by ELISPOT showed at least 40% reduction in SFCs in stored samples, with a particularly strong impact on IL-17. For both flow cytometry and ELISPOT, reduced detection rates are further aggravated by distinct differences in inter-individual cell susceptibility, leading to high variance of recovery indices.

Our findings confirm previous reports of granulocyte contamination of isolated PBMCs upon blood storage,¹¹ demonstrably interfering with T-cell metabolism and proliferation.¹⁶ Therefore, improvement of assay performance may be achieved by addition of antibodies cross-linking granulocytes to erythrocytes and, thus, increasing the efficacy of granulocyte removal during PBMC isolation, in turn leading to improved T-cell reactivity even after 24- to 32-hour pre-analytic storage.^{35,36} Other studies, however, found impaired assay performance even if blood was stored at conditions

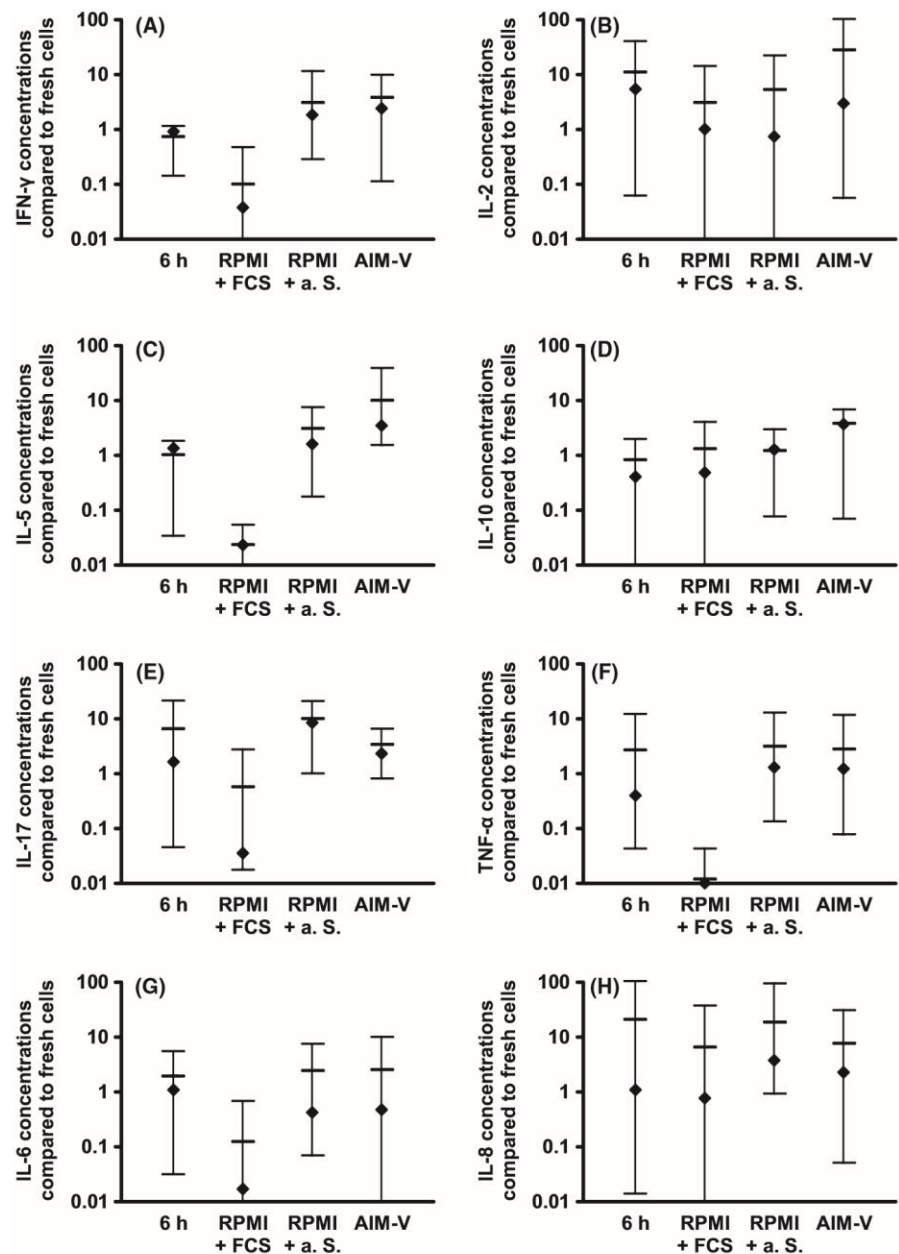


FIGURE 6 Cytokine concentrations in supernatants of lysate stimulated PBMCs depending on pre-analytic sample treatment. Cytokine levels in supernatants of *A. fumigatus* lysate stimulated PBMCs ($n = 6$) were quantified by magnetic bead-based assays (HCYTOMAG). After deduction of unspecific background secretion, fold changes of results using stored (6 h) or cryopreserved samples compared with freshly processed cells were calculated. Mean (thick horizontal lines), median (black diamonds), minimum and maximum (whiskers) fold changes are shown in the figure

reducing granulocyte activation.³⁷ As no correlation between the degree of granulocyte contamination and reduction of CD154 or cytokine-based detection of *A. fumigatus*-specific T cells was observed in our study, further metabolic changes including altered T-cellular membrane composition³⁸ or weakened APC functionality³⁹ appear to contribute to impaired assay performance.

For long-term storage of isolated cells for functional T-cell assays, an array of cryopreservation protocols is available. While most of these protocols result in sufficient yields and viability of recovered PBMCs, the functional properties of thawed cells are controversially discussed in the literature; reports range from greatly altered response patterns³¹ to maintenance of full functionality.^{22,23}

To avoid inter-batch variability of FCS and human AB serum requiring time-consuming pre-testing, we introduced a cryopreservation protocol using autologous serum,¹⁵ the composition of which

most closely resembles the in vivo situation. Contrary to a previous report of reduced cell recovery from samples frozen in serum-supplemented media,¹⁸ yields in the present study exceeded those of serum-free cryopreservation (AIM-V). Despite of minor protocol changes compared with our previously published method including the use of lithium heparin anticoagulation and Leucosep™ tubes to standardise cell isolation, the results of the present study confirmed previous evidence that cryopreservation of PBMCs in RPMI supplemented with autologous serum facilitates excellent recovery of CD154⁺ *A. fumigatus*-specific T cells.¹⁵ By contrast, flow cytometric detection of IFN- γ ⁺ cells showed lower concordance of fresh and frozen cells and a tendency towards reduced detection rates in frozen cells, matching previous observations on *Plasmodium falciparum* TRAP peptide reactive T-helper cells.⁴⁰ Cryopreservation of PBMCs using AIM-V or FCS-supplemented RPMI resulted in poor

performance of CD154- and IFN- γ -based-specific T-cell quantification, with high unspecific background and weak correlation with immediately processed samples.

Overnight resting of thawed cells as recommend in other reports^{26,41} slightly increased absolute CD154-based detection rates of *A. fumigatus*-specific T cells, but did not contribute to the discrimination of low and high test results. Factoring in significantly greater cell loss and processing time as well as the possibility of false-positive results when using defined limits for test positivity in the clinical setting, our results suggest omitting cell resting after cryopreservation for CD154-based-*A. fumigatus*-specific T-cell quantification from lysate-stimulated PBMCs. As, on the other hand, alteration of assay performance by overnight resting depends on antigens⁴¹ and readout markers,⁴² re-evaluation will be necessary if stimulatory cocktail or readout markers are modified. Reduced assay precision in thawed samples, possibly reflective of cellular stress due to thawing and multiple centrifugation steps prior to cell stimulation, should be counteracted by increasing the target amount of flow cytometrically acquired CD4⁺ cells.

For ELISPOT and multiplex cytokine analyses, neither serum-supplemented nor serum-free cryopreservation resulted in sufficient concordance with freshly analysed samples. Interestingly, serum-supplemented samples showed less pronounced impairment of ELISPOT than AIM-V cryopreservation. While convincing performance of serum-free cryopreservation was previously documented,^{21,23} none of these studies directly compared results in freshly isolated and thawed samples. Using FCS-supplemented freezing media, others reported low unspecific background and mostly reproducible SFC counts for fresh and frozen PBMCs stimulated with CMV, EBV, mumps, grass or dust antigens, with occasional statistically significant differences.²² This study, however, still highlighted the difficulty to standardise ELISPOT after cryopreservation. Individual recovery indices of antigen-specific responses ranged from 25% to 294% and even varied significantly in 3 subsequent experimental runs using samples from the same donors.²²

Differences in susceptibility of T-cell subsets to cryopreservation may explain the broad bandwidth of assay performance in thawed samples.^{19,31,40,43,44} In particular, CD4⁺ cells were reported to exhibit greater susceptibility to cryopreservation than CD8⁺ cells.^{19,31,40,43} Freezing also differently affects T-helper cell subsets, with a significant decline of naive and central memory cells,^{43,44} suggesting that antigens eliciting a prominent response of these cell types enhance susceptibility of assay performance to cryopreservation. Central memory and naive CD4⁺ T cells constitute 51%-100% of the total *A. fumigatus* reactive T-helper cell population after PBMC stimulation with the mycelial lysate employed in this study,³⁰ possibly contributing to highly variable performance of *A. fumigatus*-reactive T-cell quantification using frozen PBMCs. Moreover, significantly declined T_H17 cell frequencies after cryopreservation⁴³ may explain our observation of highly impaired IL-17 ELISPOT performance.

In summary, our findings document that flow cytometry, ELISPOT and multiplex cytokine assays for *A. fumigatus*-specific

T-cell quantification and characterisation are differentially susceptible to pre-analytic storage and cryopreservation. Even using the same readout technology, individual analytes widely varied in their susceptibility. Each of the studied freezing media was favourable for certain analytes, highlighting that cryopreservation protocols need to be optimised distinctly for each assay and analyte. To account for differently shifting temporal expression kinetics of analytes,³¹ particular focus needs to be placed on stimulation protocols. Selection of antigenic stimuli greatly influences phenotypes of stimulated cells⁴⁵ and technical parameters including optimal stimulation periods,⁴⁶ but also appears to impact the test performance after cryopreservation.^{20,40} Comprehensive assessment of different antigens, functional signatures of activated T cells and their impact on test performance after pre-analytic delays and cryopreservation may facilitate the development of more robust assay protocols. This step will be pivotal to pave the way for multi-centric evaluation of mould-specific-T-cell assays in medical mycology, conceivably resulting in the identification of stimulation and readout protocols providing an ideal compromise between diagnostic value, technical robustness and logistical convenience.

ACKNOWLEDGEMENT

We want to thank all blood donors for their voluntary donation. This work was supported by the Bavarian Ministry of Economics, Media, Energy and Technology (grant number BayBIO-1606-003, "T-cell based diagnostic monitoring of invasive aspergillosis in haematological patients"), and the Interdisciplinary Centre for Clinical Research (IZKF) Wuerzburg (grant number Z-3/56 to SW).

CONFLICT OF INTERESTS

ELISPOT plates were kindly provided by Lophius Biosciences. None of the authors have conflicts of interest related to this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CDL and SW designed the study, performed experiments, analysed data and wrote the manuscript. LP performed experiments and contributed to the manuscript. ML and MD performed experiments. PW analysed data and contributed to the manuscript. AJU, HE and JL supervised the study and contributed to the manuscript. All authors read and acknowledged the final version of the manuscript.

ORCID

Sebastian Wurster  <http://orcid.org/0000-0002-7784-7256>

REFERENCES

1. Ciabattini A, Pettini E, Medagliani D. CD4(+) T cell priming as biomarker to study immune response to preventive vaccines. *Front Immunol*. 2013;4:421.

2. Richeldi L, Losi M, Cerri S, et al. Using ELISpot technology to improve the diagnosis of tuberculosis infection: from the bench to the T-SPOT.TB assay. *Expert Rev. Respir Med.* 2008;2:253-260.
3. Bacher P, Steinbach A, Kniemeyer O, et al. Fungus-specific CD4(+) T cells for rapid identification of invasive pulmonary mold infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;191:348-352.
4. Potenza L, Vallerini D, Barozzi P, et al. Mucorales-specific T cells emerge in the course of invasive mucormycosis and may be used as a surrogate diagnostic marker in high-risk patients. *Blood.* 2011;118:5416-5419.
5. Potenza L, Vallerini D, Barozzi P, et al. Characterization of specific immune responses to different *Aspergillus* antigens during the course of invasive Aspergillosis in hematologic patients. *PLoS ONE.* 2013;8:e74326.
6. Potenza L, Vallerini D, Barozzi P, et al. Mucorales-specific T cells in patients with hematologic malignancies. *PLoS ONE.* 2016;11:e0149108.
7. Köhler FC, Cornely OA, Wisplinghoff H, et al. *Candida* reactive T cells for diagnosis of invasive *Candida* infection. ePoster presentation (EP0702) at European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2017, Vienna, Austria.
8. Rosenblum Lichtenstein JH, Hsu YH, Gavin IM, et al. Environmental mold and mycotoxin exposures elicit specific cytokine and chemokine responses. *PLoS ONE.* 2015;10:e0126926.
9. Wurster S, Weis P, Page L, et al. Intra- and inter-individual variability of *Aspergillus fumigatus* reactive T-cell frequencies in healthy volunteers in dependency of mould exposure in residential and working environment. *Mycoses.* 2017;60:668-675.
10. Stuehler C, Nowakowska J, Bernardini C, et al. Multispecific *Aspergillus* T cells selected by CD137 or CD154 induce protective immune responses against the most relevant mold infections. *J Infect Dis.* 2015;211:1251-1261.
11. Papadopoulou A, Kaloyannidis P, Yannaki E, et al. Adoptive transfer of *Aspergillus*-specific T cells as a novel anti-fungal therapy for hematopoietic stem cell transplant recipients: progress and challenges. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;98:62-72.
12. Barnes RA. Early diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(Suppl 1):i3-i6.
13. Johnson G, Ferrini A, Dolan SK, et al. Biomarkers for invasive aspergillosis: the challenges continue. *Biomark Med.* 2014;8:429-451.
14. Mallone R, Mannering SI, Brooks-Worrell BM, et al. Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clin Exp Immunol.* 2011;163:33-49.
15. Wurster S, Weis P, Page L, et al. Quantification of *A. fumigatus*-specific CD154⁺ T-cells: preanalytic considerations. *Med Mycol.* 2017;55:223-227.
16. McKenna KC, Beatty KM, Vicetti Miguel R, et al. Delayed processing of blood increases the frequency of activated CD11b⁺ CD15⁺ granulocytes which inhibit T cell function. *J Immunol Methods.* 2009;341:68-75.
17. Yun JW, Chung HS, Koh WJ, et al. Significant reduction in rate of indeterminate results of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test by shortening incubation delay. *J Clin Microbiol.* 2014;52:90-94.
18. Disis ML, dela Rosa C, Goodell V, et al. Maximizing the retention of antigen specific lymphocyte function after cryopreservation. *J Immunol Methods* 2006;308:13-18.
19. Owen RE, Sinclair E, Emu B, et al. Loss of T cell responses following long-term cryopreservation. *J Immunol Methods.* 2007;326:93-115.
20. Maecker HT, Dunn HS, Suni MA, et al. Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *J Immunol Methods.* 2001;255:27-40.
21. Filbert H, Attig S, Bidmon N, et al. Serum-free freezing media support high cell quality and excellent ELISPOT assay performance across a wide variety of different assay protocols. *Cancer Immunol Immunother.* 2013;62:615-627.
22. Kreher CR, Dittrich MT, Guerkov R, et al. CD4⁺ and CD8⁺ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. *J Immunol Methods.* 2013;278:79-93.
23. Germann A, Schulz JC, Kemp-Kamke B, et al. Standardized serum-free cryomedia maintain peripheral blood mononuclear cell viability, recovery, and antigen-specific T-cell response compared to fetal calf serum-based medium. *Biopreserv Biobank.* 2011;9:229-236.
24. Jolink H, Meijssen IC, Hagedoorn RS, et al. Characterization of the T-cell-mediated immune response against the *Aspergillus fumigatus* proteins Crf1 and catalase 1 in healthy individuals. *J Infect Dis.* 2013;208:847-856.
25. Martinuzzi E, Scotto M, Enée E, et al. Serum-free culture medium and IL-7 costimulation increase the sensitivity of ELISPOT detection. *J Immunol Methods.* 2008;333:61-70.
26. Wang L, Huckelhoven A, Hong J, et al. Standardization of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells through a resting process for clinical immunomonitoring—Development of an algorithm. *Cytometry A.* 2016;89:246-258.
27. Britten CM, Janetzki S, Butterfield LH, et al. T cell assays and MIATA: the essential minimum for maximum impact. *Immunity.* 2012;37:1-2.
28. Allan AL, Keeney M. Circulating tumor cell analysis: technical and statistical considerations for application to the clinic. *J Oncol.* 2010;2010:426218.
29. Bacher P, Scheffold A. Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. *Cytometry A.* 2013;83:692-701.
30. Wurster S, Page L, Weis P, et al. Environmental mould exposure leads to elevated Mucorales specific T-helper and T-memory cell frequencies in healthy adults. Poster presentation (P0971) at European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2017, Vienna, Austria.
31. Jeurink PV, Vissers YM, Rappard B, et al. T cell responses in fresh and cryopreserved peripheral blood mononuclear cells: kinetics of cell viability, cellular subsets, proliferation, and cytokine production. *Cryobiology.* 2008;57:91-103.
32. Bull M, Lee D, Stucky J, et al. Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials. *J Immunol Methods.* 2007;322:57-69.
33. Shanaube K, De Haas P, Schaap A, et al. Intra-assay reliability and robustness of QuantiFERON(R)-TB Gold In-Tube test in Zambia. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010;14:828-833.
34. Herrera V, Yeh E, Murphy K, et al. Immediate incubation reduces indeterminate results for QuantiFERON-TB Gold in-tube assay. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2672-2676.
35. Wang SH, Stew SS, Cyktor J, et al. Validation of increased blood storage times with the T-SPOT.TB assay with T-Cell Xtend reagent in individuals with different tuberculosis risk factors. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2469-2471.
36. Talbot EA, Maro I, Ferguson K, et al. Maintenance of sensitivity of the T-SPOT.TB assay after overnight storage of blood samples, Dar es Salaam, Tanzania. *Tuberc Res Treat.* 2012;2012:345290.
37. Afonso G, Scotto M, Renand A, et al. Critical parameters in blood processing for T-cell assays: validation on ELISPOT and tetramer platforms. *J Immunol Methods.* 2010;359:28-36.
38. Fahmy TM, Bieler JG, Edidin M, et al. Increased TCR avidity after T cell activation: a mechanism for sensing low-density antigen. *Immunity.* 2001;14:135-143.
39. Johnston L, Harding SA, La Flamme AC. Comparing methods for ex vivo characterization of human monocyte phenotypes and in vitro responses. *Immunobiology.* 2015;220:1305-1310.
40. Ford T, Wenden C, Mbekeani A, et al. Cryopreservation-related loss of antigen-specific IFN γ producing CD4⁺ T-cells can skew

- immunogenicity data in vaccine trials: lessons from a malaria vaccine trial substudy. *Vaccine*. 2017;35:1898-1906.
41. Santos R, Buying A, Sabri N, et al. Improvement of IFNg ELISPOT performance following overnight resting of frozen PBMC samples confirmed through rigorous statistical analysis. *Cells*. 2014;4:1-18.
 42. Kutscher S, Dembek CJ, Deckert S, et al. Overnight resting of PBMC changes functional signatures of antigen specific T-cell responses: impact for immune monitoring within clinical trials. *PLoS ONE*. 2013;8:e76215.
 43. Lemieux J, Jobin C, Simard C, et al. A global look into human T cell subsets before and after cryopreservation using multiparametric flow cytometry and two-dimensional visualization analysis. *J Immunol Methods*. 2016;434:73-82.
 44. Costantini A, Mancini S, Giuliodoro S, et al. Effects of cryopreservation on lymphocyte immunophenotype and function. *J Immunol Methods*. 2003;278:145-155.
 45. Dunn HS, Haney DJ, Ghanekar SA, et al. Dynamics of CD4 and CD8 T cell responses to cytomegalovirus in healthy human donors. *J Infect Dis*. 2002;186:15-22.
 46. Kaveh DA, Whelan AO, Hogarth PJ. The duration of antigen-stimulation significantly alters the diversity of multifunctional CD4 T cells measured by intracellular cytokine staining. *PLoS ONE*. 2012;7:e38926.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

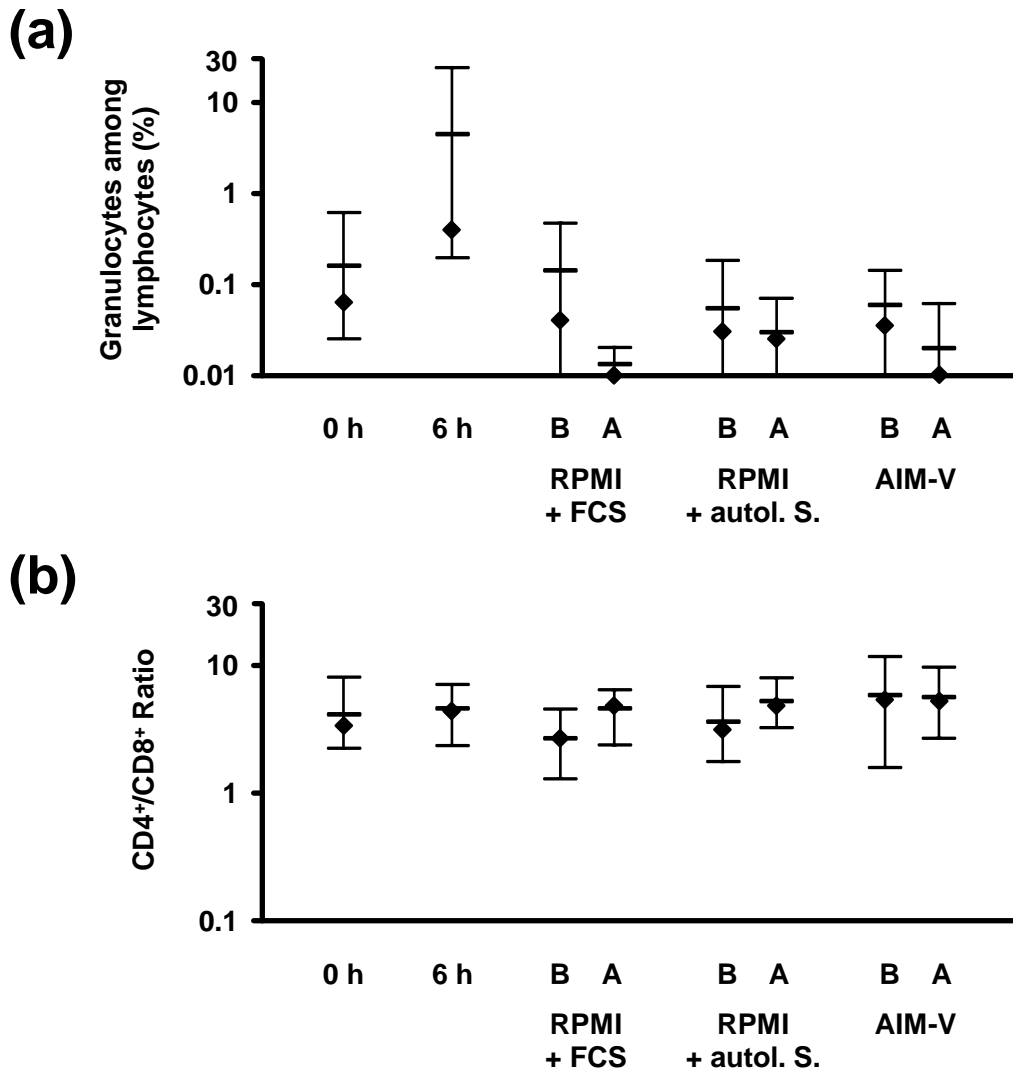
How to cite this article: Lauruschkat CD, Wurster S, Page L, et al. Susceptibility of *A. fumigatus*-specific T-cell assays to pre-analytic blood storage and PBMC cryopreservation greatly depends on readout platform and analytes. *Mycoses*. 2018;61:549-560. <https://doi.org/10.1111/myc.12780>

3.1.1 Supplement

Susceptibility of *A. fumigatus* specific T-cell assays to pre-analytic blood storage and PBMC cryopreservation greatly depends on readout platform and analytes

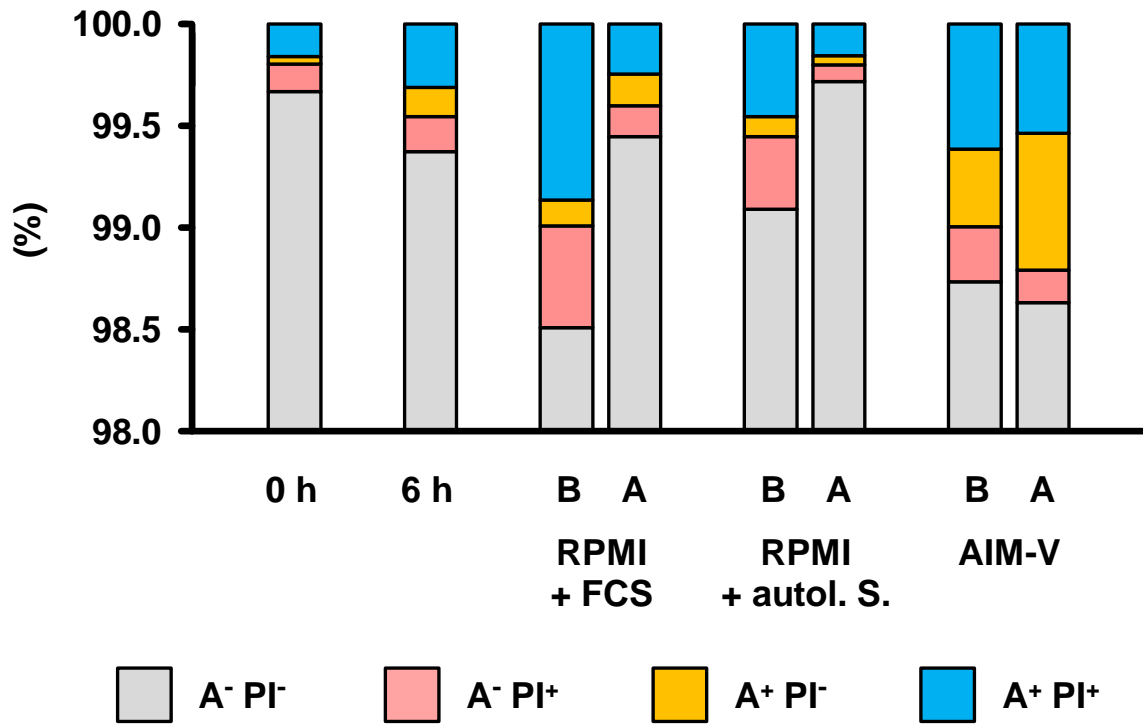
Lauruschkat CD*, Wurster S*, Page L, Lazariotou M, Dragan M, Weis P, Ullmann AJ, Einsele H., Löffler.

* geteilte Erstautorenschaft



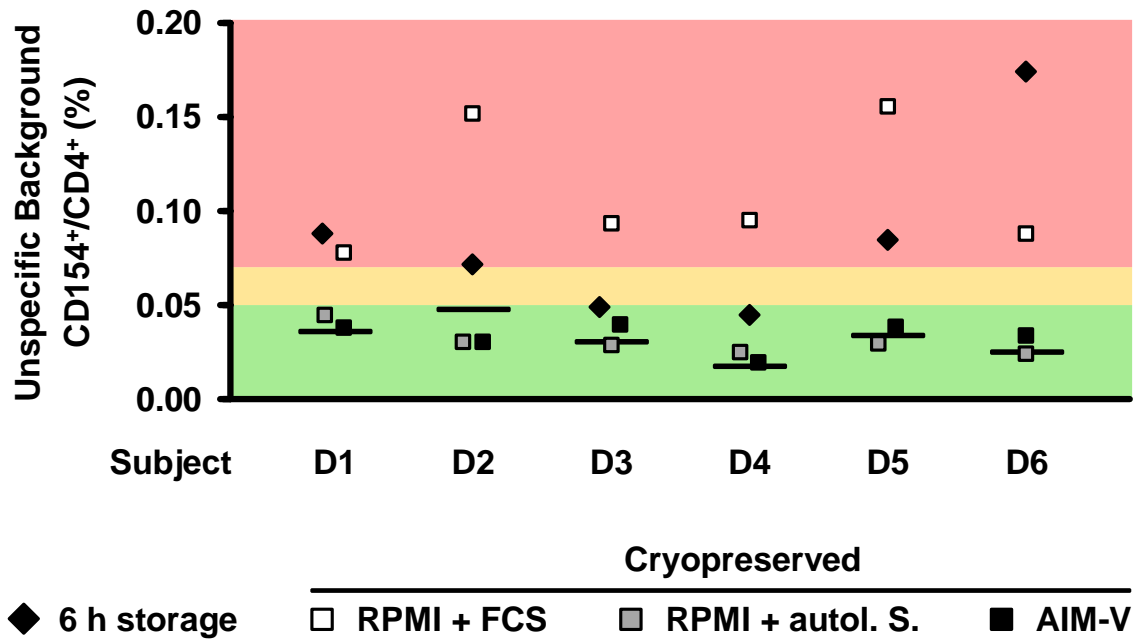
Supplementary Figure 1: Granulocyte contamination and CD4⁺/CD8⁺ ratios of PBMC samples

Granulocyte content (a) (SSC properties and CD66b-PE staining) and CD4⁺/CD8⁺ ratios (b) of leukocyte samples were determined by flow cytometry. Fresh (0 h), stored (6 h), and cryopreserved samples were assessed. Thawed samples were measured before [B] and after [A] resting. Thick horizontal lines and black diamonds indicate mean (n = 6) and median values, respectively. Whiskers represent minimum and maximum values.



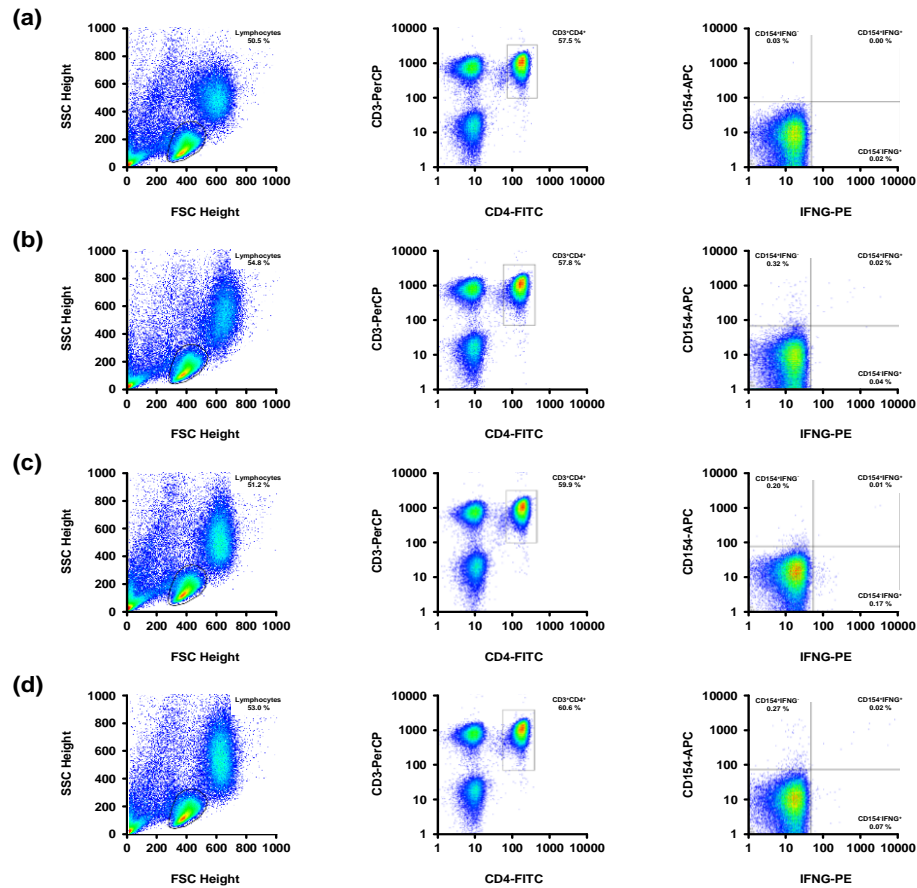
Supplementary Figure 2: Assessment of lymphocyte viability depending on pre-analytical sample treatment

Lymphocyte viability was assessed by CD3-FITC, propidium iodide [PI], and Annexin V-APC [A] staining. Fresh (0 h), stored (6 h), and cryopreserved samples were assessed. B = before resting, A = after resting. Mean values (n = 6) are shown in the figure.



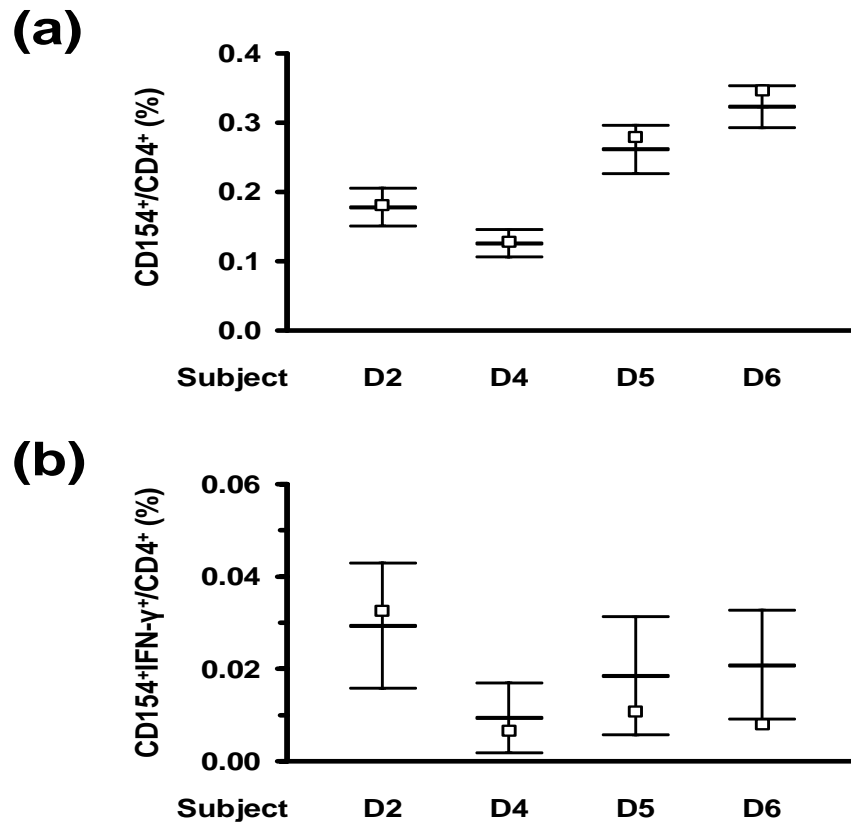
Supplementary Figure 3: Unspecific background frequencies of CD154⁺/CD4⁺ cells depending on pre-analytic sample treatment

The figure compares unspecific background frequencies of CD154⁺/CD4⁺ T-helper cells after stimulation of PBMCs with α -CD28 \pm *A. fumigatus* mycelial lysates, addition of brefeldin A, and overnight culture as described in the Methods section.



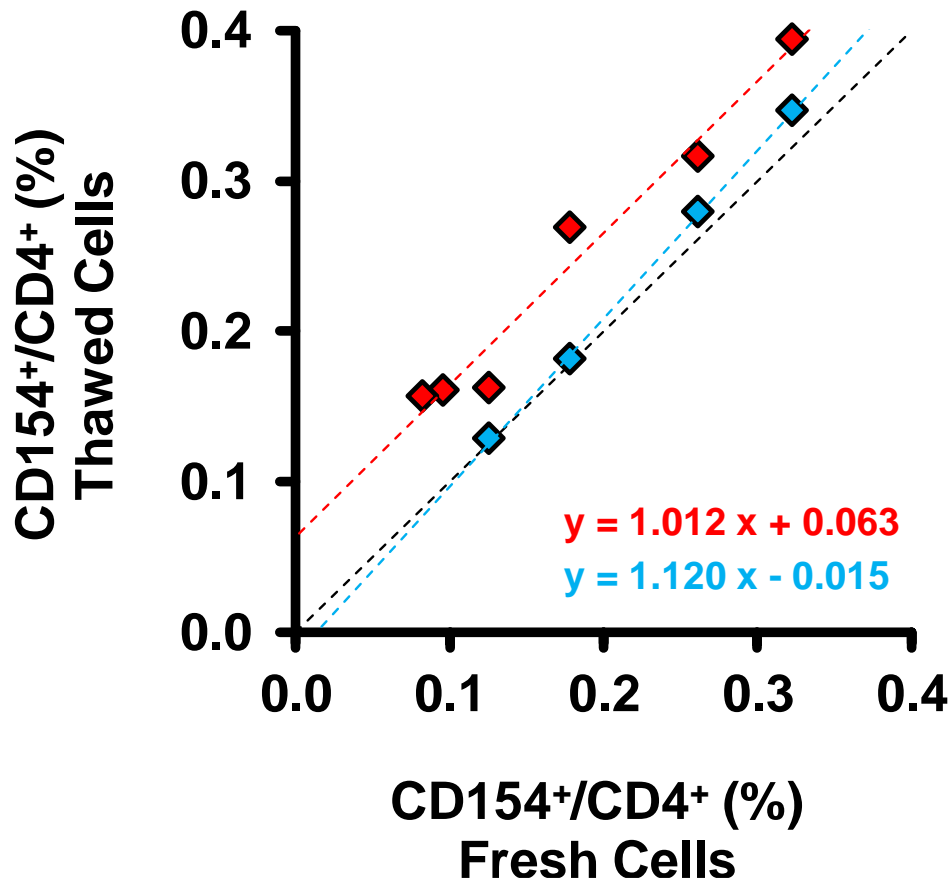
Supplementary Figure 4: Exemplary data set for flow cytometry and gating strategy

After stimulation, brefeldin A treatment, and staining of PBMCs as described in the methods section, 100000 lymphocytes were acquired flow cytometrically according to FSC/SSC properties (left column). $CD3^+CD4^+$ cells among lymphocytes were selected with a rectangular gate using FlowJo analysis software (middle column). $CD3^+CD4^+$ cells were assessed for CD154 and cytokine expression (here: IFN- γ) and split into four adjacent subpopulations using the quadrant tool. All data shown in this exemplary data set were obtained using PBMCs from the same donor (D6). **a)** Immediately processed cells stimulated with α -CD28, **b)** immediately processed cells stimulated with α -CD28 and *A. fumigatus* lysate, **c)** cells isolated after 6 h blood storage stimulated with α -CD28 (showing significantly elevated CD154 expression compared to immediately processes cells), **d)** cells isolated after 6 h blood storage stimulated with α -CD28 and *A. fumigatus* lysate.



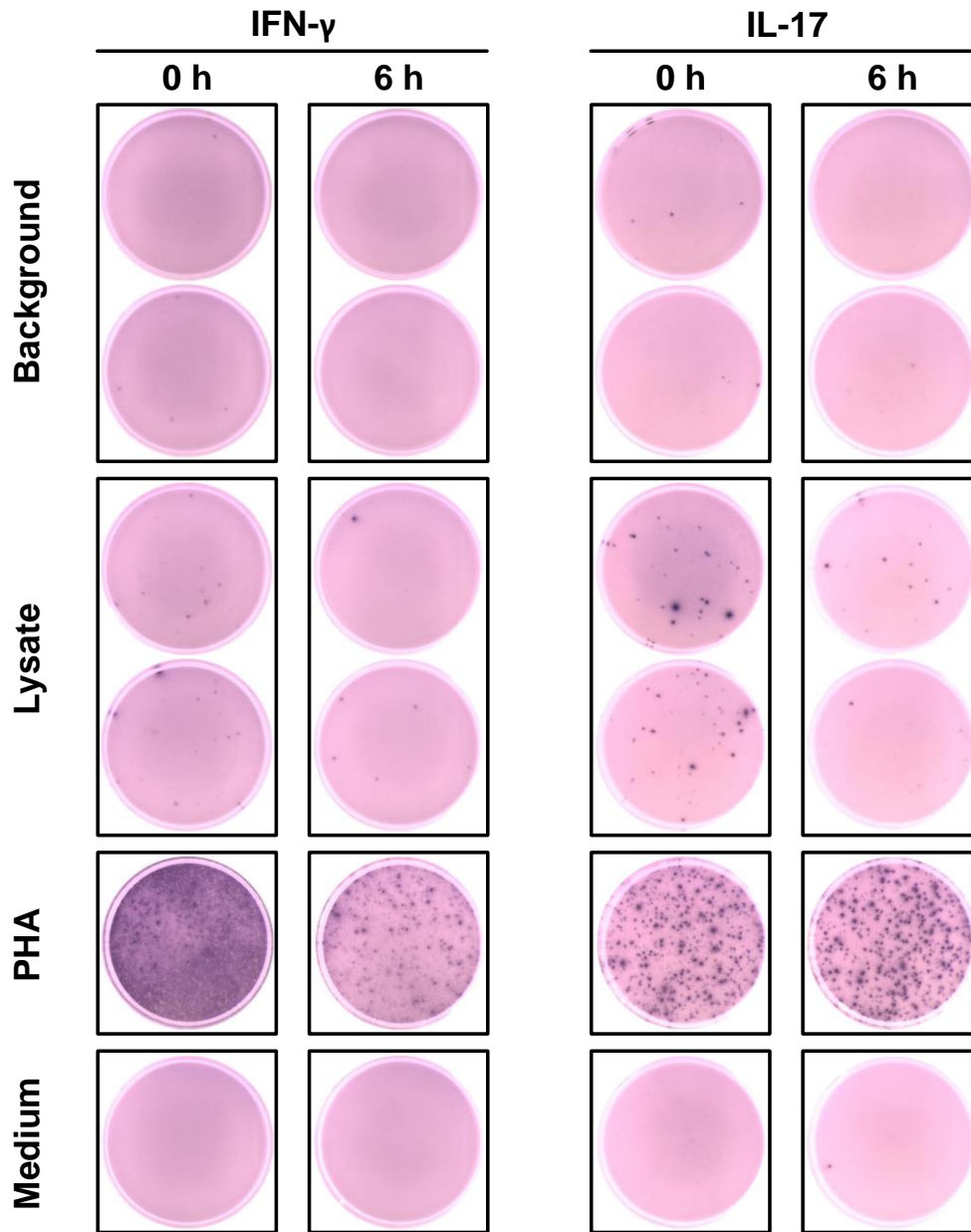
Supplementary Figure 5: Flow cytometric detection rates of *A. fumigatus* reactive T-cells in thawed samples without cell resting before stimulation

PBMCs cryopreserved in RPMI + autologous serum (+ DMSO) were thawed and plated for stimulation without prior overnight resting. Remaining aliquots from four out of six donors (D2, D4, D5, D6) were available for this experiment. *A. fumigatus* specific T-cells were quantified by intracellular CD154 and IFN- γ staining after stimulation of PBMCs with α -CD28 \pm *A. fumigatus* mycelial lysates, addition of brefeldin A, and overnight culture as described in the Methods section. CD154+/CD4+ (a) and CD154+IFN- γ +/CD4+ (b) *A. fumigatus* reactive T-cell frequencies of four donors are shown in the figure (blank squares). Thick horizontal bars and whiskers indicate test results obtained using immediately processed samples and their 95 % confidence interval, respectively.



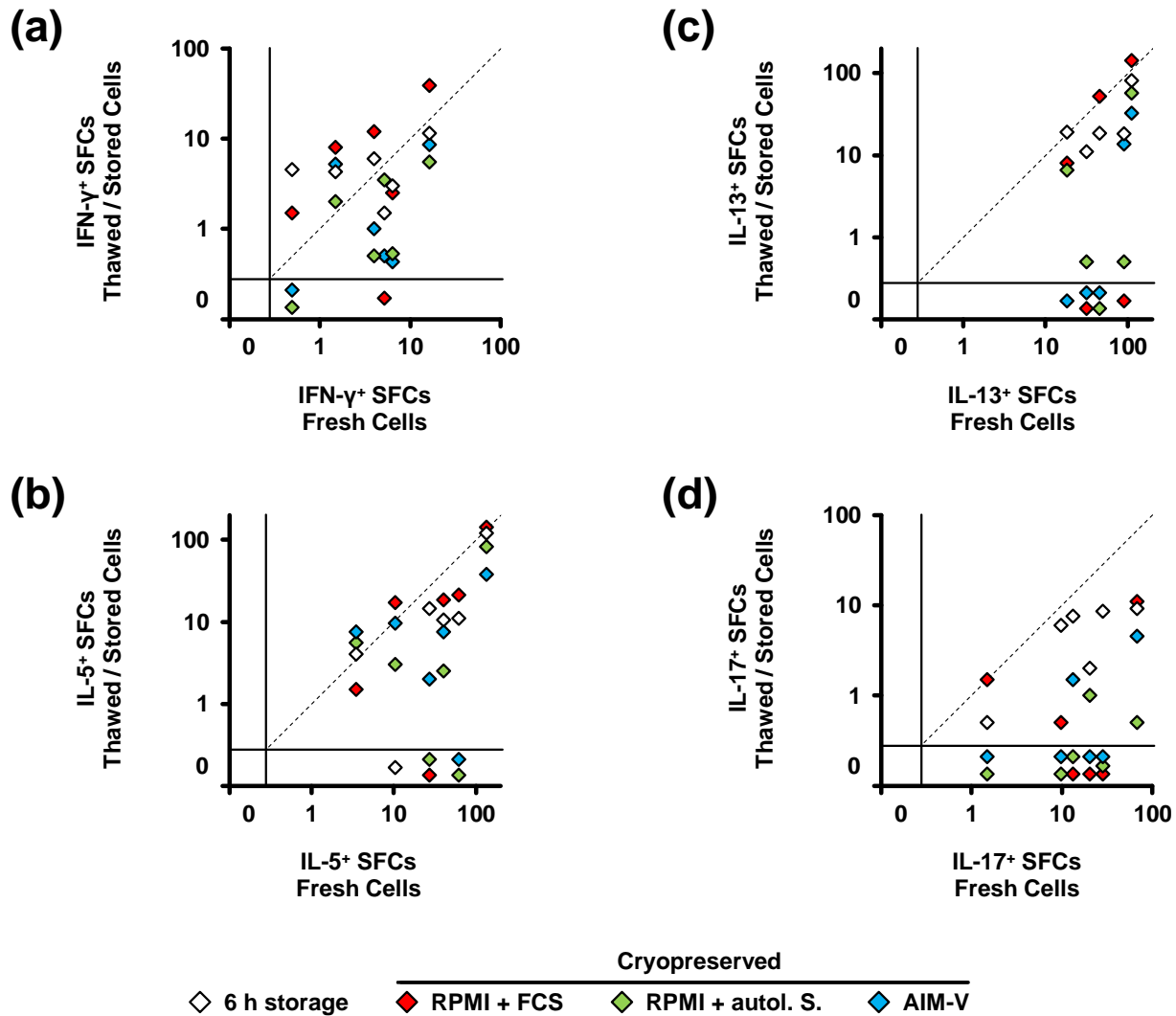
Supplementary Figure 6: Impact of overnight resting of thawed cells on CD154-based *A. fumigatus* specific T-cell detection rates

PBMCs cryopreserved in RPMI + autologous serum (+ DMSO) were thawed and plated either immediately (n = 4, blue diamonds, raw data in **Sup. Figure 4**) or after overnight resting (n = 6, red diamonds, raw data in **Figure 4**). Following stimulation of PBMCs with α -CD28 \pm *A. fumigatus* mycelial lysates, addition of brefeldin A, and overnight culture, CD154⁺/CD4⁺ *A. fumigatus* reactive T-cell frequencies were determined by flow cytometry and compared with results obtained using immediately processed samples (x-values). Linear regression analysis was performed. Slopes and y-intercepts are provided in the figure.



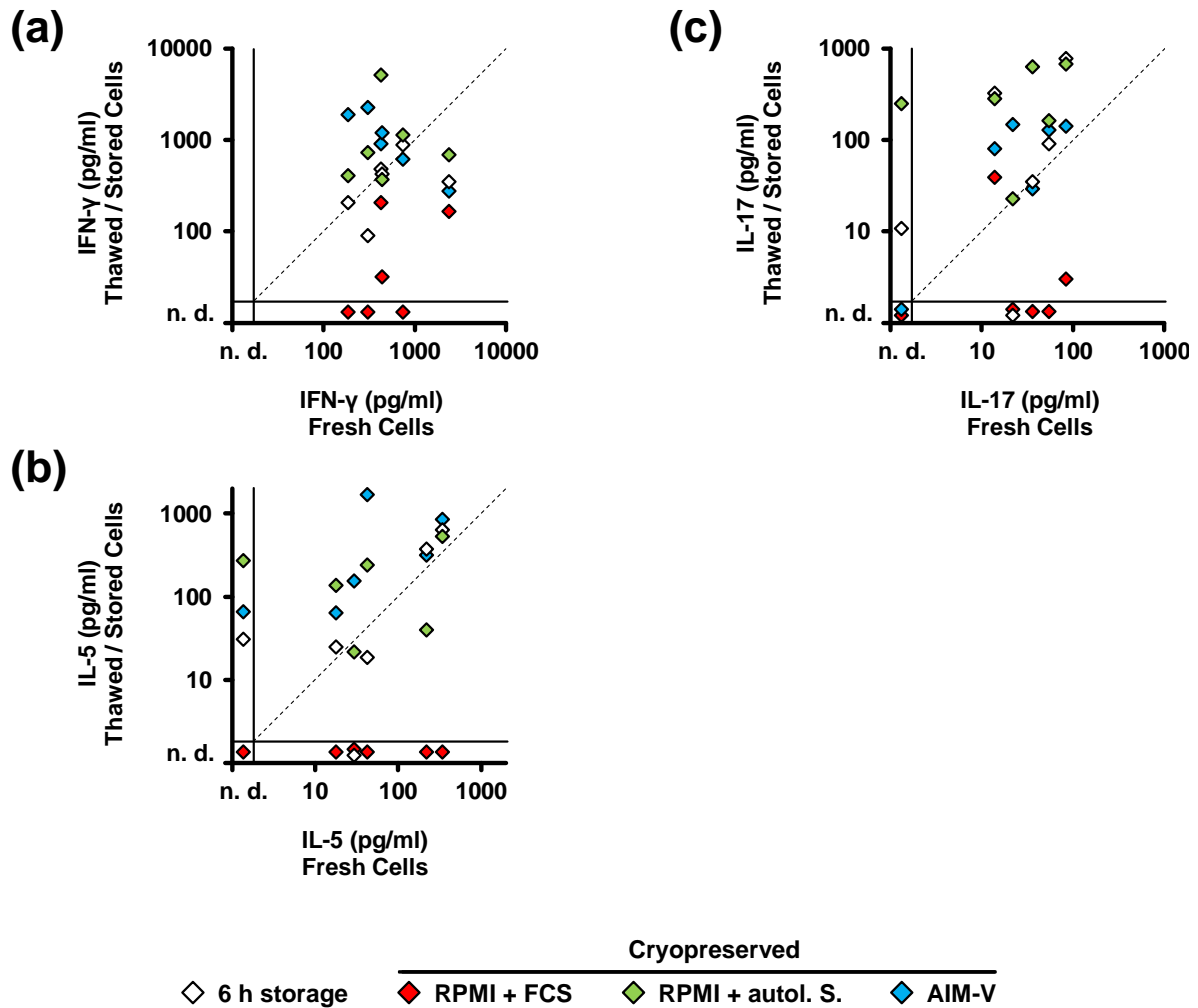
Supplementary Figure 7: Representative data set for ELISPOT documenting reduced SFC counts and elevated coefficients of variation after 6 h blood storage

ELISPOT was performed as described in the Methods section. Data shown in this exemplary data set were obtained using PBMCs from the same donor (D5). α -CD28 and α -CD49d costimulatory antibodies were added to both background and *A. fumigatus* lysate wells for IFN- γ ELISPOT. PHA was used as positive control, culture medium without PBMCs as negative control.



Supplementary Figure 8: Comparative analysis of individual ELISPOT counts depending on pre-analytic sample handling

A. fumigatus specific T-cells were quantified by IFN- γ (a), IL-5 (b), IL-13 (c), and IL-17 (d) ELISPOT as described in the Methods section. Individual SFC counts per 200000 stimulated PBMCs after deduction of unspecific background are shown in the figure. Stored and cryopreserved samples (y-values) were compared with freshly prepared cells (x-values).



Supplementary Figure 9: Comparative analysis of individual concentrations of selected cytokines in PBMC supernatants depending on pre-analytic sample handling

IFN- γ (a), IL-5 (b), and IL-17 (c) concentrations in supernatants of *A. fumigatus* lysate stimulated PBMCs (n = 6) were quantified by magnetic bead based assays (HCYTOMAG). Unspecific background was deduced from results of lysate stimulated samples. Stored and cryopreserved samples (y-values) were compared with freshly prepared cells (x-values). "n. d." indicates that no cytokine secretion exceeding background was detected.

	RPMI + FCS	RPMI + autol. serum	AIM-V
Freezing Medium	50 % RPMI 40 % FCS 10 % DMSO	70 % RPMI 20 % autol. Serum 10% DMSO	90 % AIM-V 10% DMSO
Thawing Medium	90 % RPMI 10 % FCS	95 % RPMI 5 % autol. Serum	AIM-V
Washing Medium	RPMI	RPMI	AIM-V
Resting Medium	90 % RPMI 10 % FCS	95 % RPMI 5 % autol. Serum	AIM-V
Culture Medium for Flow Cytometry and Multiplex Cytokine Assays	95 % RPMI 5 % autol. Serum	95 % RPMI 5 % autol. Serum	95 % RPMI 5 % autol. Serum
Culture Medium for ELISPOT	AIM-V	AIM-V	AIM-V

Supplementary Table 1: Overview of media used for different freezing, thawing, and resting protocols

Module 1: Sample		
1.1	Essential donor info	Healthy volunteers aged 25 to 29 years, 2 male, 4 female. Exclusion criteria: Signs and symptoms of acute or chronic infections, antibiotic / antifungal treatment within past 4 weeks, immunosuppressive treatment within past 12 weeks, diabetes mellitus, pregnancy.
1.2	Source of cell material	Venous whole blood
1.3	Collection methodology	Monovette® blood collection system + 19 G butterfly needle
1.4	Anti-coagulant	Lithium heparin
1.5	Transportation / storage conditions for unprocessed samples	Venipuncture was performed in the laboratory and samples were processed onsite. Samples stored for 6 hours prior to processing were kept at room temperature.
1.6	Cell processing methodology	PBMC isolation using Leucosep™ centrifuge tubes and ficoll (1.077 g/ml)
1.7	Median time and ranges from sample collection until end of cell processing	Processing time from blood draw until begin of centrifugation (of immediately processed samples) ranged from 18 to 24 min (median: 21 min). Processing time from blood draw to cell counting and completion of cryopreservation ranged from 84 to 115 min (median: 106 min) and 155 to 175 min (median: 158 min), respectively.
1.8	Cut-offs	Periods from blood draw to begin of gradient centrifugation, cell counting, and completion of cryopreservation must not exceed 30 min, 120 min, and 180 min, respectively.
1.9	Fresh or cryopreserved	Fresh, stored, and cryopreserved cells were comparatively analysed (Fig. 1).
1.10	Devices used for cryopreservation	Mr. Frosty™ freezing container
1.11	Freezing process	Described in the Methods section
1.12	Medium used for freezing	Three different media were comparatively assessed. Details for each processing step are summarized in Sup. Table 1 .
1.13	Median time and temperature for each transportation and storage step	Transportation was not required as cells were stored onsite. Median storage time at -80 °C: 76 hours, median (subsequent) storage time in liquid nitrogen: 31 days.
1.14	Cut-offs	Storage time at -80 °C: 72 to 120 hours.
1.15-1.18	Median cell yield and viability	Summarized in Fig. 2
1.19	Cut-offs	Cut-off for trypan blue negative and Annexin/PI negative cells in immediately processed samples: 95 %. No cut-offs were applied to stored cryopreserved samples as yield and viability were endpoints of the study.
1.20	Cell counting methodology	Microscopic counting using a modified Neubauer chamber.
1.21	Additional assessments	Cell composition after isolation, thawing, and resting was determined

Module 5: Laboratory		
5.1	Guidance of lab operations	Experiments were conducted under GLP principles. SOPs were prepared by CDL (ELISPOT) and SW (Cell isolation, cryopreservation, flow cytometry) and reviewed by all authors. Lab members were trained thoroughly. Process related parameters were documented in standardized case report forms.
5.2	Laboratory accreditations and certifications	n/a
5.3	Details on audits	n/a
5.4	Status of protocols	Monocentric study with SOPs followed by all authors.
5.5	Status of assays	The study was performed using qualified (Flow cytometry, IFN- γ ELISPOT, multiplex cytokine assays) and investigative (IL-5, IL-13, and IL-17 ELISPOT) assays.
5.6	Specific performance criteria	n/a

Supplementary Table 2a: General MIATA modules (module 1 and 5)

Module 2: Assay		
2.1	Medium and serum details	RPMI 1640 (Gibco) + 5% autologous heat-inactivated, sterile-filtered serum was used for PBMC culture and stimulation.
2.2	Pre-testing information	As sterile-filtered autologous serum was used, pre-testing was not required.
2.3	Treatment procedures of cells prior to assay	Described in Methods section
2.4	Sufficient assay details	
2.5	Internal assay controls	1 µg/ml α-CD28 were used as unspecific background control and reactive T-cell frequencies were deduced from all specific measurements. PHA-stimulated positive controls were used for adjusting instruments settings (compensation).
2.6	Acceptance criteria	Unspecific background of CD154 ⁺ /CD4 ⁺ cells in α-CD28-only samples must not exceed 0.07 %.
2.7	External reference samples	n/a
2.8	Assay acceptance criteria	n/a
Module 3: Data acquisition		
3.1	Equipment and software	FACS Calibur & Cell Quest Pro Software (BD)
3.2	Basic equipment settings	Acquisition will stop when 100000 in G1=R1 (lymphocyte gate according to FSC/SSC properties), resolution: 1024. Compensation was performed individually for each donor and panel.
3.3	Detailed gating strategy	Sup. Fig. 4
3.4	Representative data set	
3.5	Mean, median, ranges of event counts for relevant populations	Relevant populations and statistical details are summarized in Sup. Table 3 .
3.6	Unusual strategies explained	n/a
3.7	Review of raw data	Raw data were reviewed by at least two authors.

Module 4: Results		
4.1	Background and ag-specific reactivity levels	Background and antigen-specific responses depending on pre-analytic sample handling are summarized in Sup. Table 3 . Individual background values for CD154 ⁺ /CD4 ⁺ cells are shown in Sup. Fig. 3 .
4.2	Cut-off specifications	Unspecific background of CD154 ⁺ /CD4 ⁺ cells in α-CD28-only samples must not exceed 0.07 %.
4.3	Accessibility of raw data	Donor record forms, flow cytometric files and data printouts are stored onsite and were carefully reviewed by at least two authors. Relevant raw data are summarized in Sup. Table 3 .
4.4	Definition of positive reactivity (above background) including tests applied	As mould-reactive T-cells are detectable in most healthy donors, no cut-off specifications for reactivity were applied. In this study, “ <i>A. fumigatus</i> reactive T-cells” are defined as T-cells upregulating activation markers (e. g. CD154) upon stimulation with mycelial lysates + costimulatory factors, whereas “ <i>A. fumigatus</i> specific” T-cell frequencies are calculated by deducing unspecific background (costimulatory factors only) from <i>A. fumigatus</i> reactive T-cells numbers.
4.5	Parameters, software and version used for response determination	Analysis was performed using FlowJo vX.0.7.
4.6	Response definition predefined or post-hoc	n/a
4.7	Definition of response induced by treatment	n/a
4.8	Any data excluded and why	no data excluded
4.9	Why test was used	Flow cytometric mould specific T-cell quantification was described as a novel biomarker to monitor invasive mycoses (3) and environmental mould exposure (9) Better standardization of pre-analytic sample processing is desirable to facilitate multi centric studies and is therefore addressed in the present study.

Supplementary Table 2b: Assay specific MIATA modules (module 2 – 4) for flow cytometry

Module 2: Assay		
2.1	Medium and serum details	Serum free AIM-V AlbuMAX™ BSA (Thermo Fisher Scientific) was used.
2.2	Pre-testing information	The medium does not contain serum and was tested by the manufacturer.
2.3	Treatment procedures of cells prior to assay	Described in Methods section
2.4	Sufficient assay details	
2.5	Internal assay controls	Phytohemagglutinin (PHA, 40 µg/ml) was used as positive control for each donor, condition, and cytokine. At least one negative control (medium without PBMCs) was conducted on each ELISPOT plate. Additionally, results of unstimulated controls (PBMCs + costimulatory factors, without lysate) were determined and deduced from all lysate stimulated wells.
2.6	Acceptance criteria	Positive PHA control (> 200 IFN-γ ⁺ SFCs / 2 x 10 ⁵ PBMCs). Medium control < 10 SFCs / 2 x 10 ⁵ PBMCs.
2.7	External reference samples	n/a
2.8	Assay acceptance criteria	n/a
Module 3: Data acquisition		
3.1	Equipment and software	Plates were analysed on a Bioreader 5000a (BioSYS) using the Bioreader 12.1 software.
3.2	Basic equipment settings	For all cytokines the white balance was set to red: 582, blue: 531 HUE: 180. The diameter of the spots was accepted between 54 and 1000. For IFN-γ the brightness was set to 80 %, the contrast to 34 % and the sensitivity to 81%. For IL-5, IL-13 and IL-17 the following settings were used: brightness: 68 %, contrast: 32 % and sensitivity: 81 %.
3.3	Strategy for establishing spot detection parameters	Spot detection settings were chosen to detect clearly visible spots. Because of the different brightness of the membrane of the IL-5, IL-13 and IL-17 ELISPOTs compared to the IFN-γ ELISPOT, brightness and contrast had to be adjusted accordingly.
3.4	Representative data set	Sup. Fig. 7
3.5	Mean, median, ranges of event counts for relevant populations	Statistical details are summarized in Sup. Table 4.
3.6	Unusual strategies explained	n/a
3.7	Review of raw data	Raw data were reviewed by at least two authors.

Module 4: Results		
4.1	Background and ag-specific reactivity levels	Background and antigen-specific responses depending on pre-analytic sample handling are summarized in Sup. Table 4 .
4.2	Cut-off specifications	IFN- γ SFC numbers in unstimulated wells must not exceed 10 spots per 2×10^5 cells in the unstimulated wells. Cut-offs for IL-5, IL-13, and IL-17 were not determined yet as assays are considered investigative.
4.3	Accessibility of raw data	Donor record forms and readout files (SFC counts) are stored onsite and were carefully reviewed by at least two authors. Relevant raw data are summarized in Sup. Table 4 .
4.4	Definition of positive reactivity (above background) including tests applied	As mould-reactive T-cells are detectable in most healthy donors, no cut-off specifications for reactivity were applied. In this study, " <i>A. fumigatus</i> reactive" SFC counts are defined as PBMCs releasing cytokines upon stimulation with mycelial lysates + costimulatory factors, whereas " <i>A. fumigatus</i> specific" SFC counts are calculated by deducing unspecific background from <i>A. fumigatus</i> reactive SFCs.
4.5	Parameters, software and version used for response determination	Analysis was performed using Bioreader 12.1.
4.6	Response definition predefined or post-hoc	n/a
4.7	Definition of response induced by treatment	n/a
4.8	Any data excluded and why	3 out of 672 wells were excluded due to contamination.
4.9	Why test was used	ELISPOT based mould specific cell quantification was described as a novel biomarker to monitor invasive mycosis (4-6). Better standardization of pre-analytic sample processing is desirable to facilitate multi centric studies and is therefore addressed in the present study.

Supplementary Table 2c: Assay specific MIATA modules (module 2 – 4) for ELISPOT

	Fresh	Stored	Cryopreserved		
			RPMI + FCS	RPMI + autol. S.	AIM-V
Lymphocytes acquired	98919 ± 1264	98065 ± 2724	98241 ± 1256	96789 ± 1997	97759 ± 1085
CD3 ⁺ CD4 ⁺ cells acquired	54261 ± 7066	55153 ± 7865	57883 ± 6842	59652 ± 6206	57948 ± 6687
	CD154				
Mean reactive T-cells (CD154 ⁺ /CD3 ⁺ CD4 ⁺) in lysate stimulated samples (%)	0.210	0.171	0.289	0.274	0.194
Mean specific T-cells (CD154 ⁺ /CD3 ⁺ CD4 ⁺) after deduction of background (%)	0.178	0.084	0.179	0.243	0.160
Values exceeding the upper 95 % CI of fresh samples	n/a	0 (0 %)	3 (50 %)	6 (100 %)	4 (67 %)
Values below the lower 95 % CI of fresh samples	n/a	5 (83 %)	2 (33 %)	0 (0 %)	2 (33 %)
Median fold change compared to freshly isolated cells	n/a	0.44	1.30	1.40	1.31
Coefficient of correlation	n/a	0.86	0.05	0.98	-0.36
	IFN-γ				
Mean CD154 ⁺ IFN-γ ⁺ /CD3 ⁺ CD4 ⁺ frequency in lysate stimulated samples (%)	0.018	0.012	0.027	0.014	0.014
Mean CD154 ⁺ IFN-γ ⁺ /CD3 ⁺ CD4 ⁺ frequency after deduction of unspecific background (%)	0.018	0.011	0.025	0.013	0.014
Values exceeding the upper 95 % CI of fresh samples	n/a	0 (0 %)	3 (50 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Values below the lower 95 % CI of fresh samples	n/a	2 (33 %)	0 (0 %)	2 (33 %)	2 (33 %)
Relative detection rates compared to fresh cells (median fold change)	n/a	0.64	1.40	0.72	0.86
Coefficient of correlation	n/a	0.82	0.83	0.78	0.58
CD154 ⁺ IFN-γ ⁺ /CD154 ⁺ (%)	11.1	12.7	12.9	5.5	10.1
	IL-5				
Mean CD154 ⁺ IL-5 ⁺ /CD3 ⁺ CD4 ⁺ frequency after deduction of unspecific background (%)	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001
CD154 ⁺ IL-5 ⁺ /CD154 ⁺ (%)	0.2	0.2	0.1	0.3	0.6
	IL-13				
Mean CD154 ⁺ IL-13 ⁺ /CD3 ⁺ CD4 ⁺ frequency after deduction of unspecific background (%)	0.000	0.001	0.000	0.001	0.002
CD154 ⁺ IL-13 ⁺ /CD154 ⁺ (%)	0.7	0.6	0.2	0.5	1.3

	IL-17				
Mean CD154 ⁺ IL-17 ⁺ /CD3 ⁺ CD4 ⁺ frequency after deduction of unspecific background (%)	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
CD154 ⁺ IL-17 ⁺ /CD154 ⁺ (%)	1.2	0.6	0.3	0.7	0.7

Supplementary Table 3: Technical parameters of flow cytometric *A. fumigatus* specific T-cell quantification

		Fresh	Stored	Cryopreserved		
				RPMI + FCS	RPMI + autol. S.	AIM-V
IFN- γ	SFCs per 2 x 10 ⁵ PBMCs after deduction of unspecific background (mean \pm SD, p-value)	5.7 \pm 5.2	5.2 \pm 3.2 $p = 0.768$	10.4 \pm 13.2 $p = 0.296$	2.0 \pm 2.0 $p = 0.084$	2.6 \pm 3.1 $p = 0.124$
	SFCs per 2 x 10 ⁵ PBMCs in unstimulated wells (mean \pm SD)	2.0 \pm 1.9	0.6 \pm 0.7	2.8 \pm 1.5	0.7 \pm 1.3	1.2 \pm 1.1
	SFCs per 2 x 10 ⁵ PBMCs in lysate stimulated wells (mean \pm SD)	7.7 \pm 5.7	5.8 \pm 3.8	13.2 \pm 14.5	2.7 \pm 3.1	3.8 \pm 3.6
	Values exceeding the upper 95 % CI of fresh samples	n/a	1 (17 %)	3 (50 %)	0 (0 %)	1 (17 %)
	Values below the lower 95 % CI of fresh samples	n/a	1 (17 %)	1 (17 %)	3 (50 %)	3 (50 %)
	Median fold change compared to fresh cells	n/a	1.10	2.67	0.23	0.17
	Coefficient of correlation	n/a	0.74	0.86	0.81	0.71
IL-5	SFCs per 2 x 10 ⁵ PBMCs after deduction of unspecific background (mean \pm SD, p-value)	46.4 \pm 43.7	26.7 \pm 42.0 $p = 0.046$	33.2 \pm 48.9 $p = 0.166$	15.5 \pm 29.8 $p = 0.029$	10.7 \pm 12.5 $p = 0.071$
	SFCs per 2 x 10 ⁵ PBMCs in unstimulated wells (mean \pm SD)	38.0 \pm 47.7	14.1 \pm 13.8	42.6 \pm 49.2	25.3 \pm 18.6	14.8 \pm 15.4
	SFCs per 2 x 10 ⁵ PBMCs in lysate stimulated wells (mean \pm SD)	84.4 \pm 89.2	40.8 \pm 55.4	73.7 \pm 97.3	33.7 \pm 39.3	23.3 \pm 28.1
	Values exceeding the upper 95 % CI of fresh samples	n/a	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
	Values below the lower 95 % CI of fresh samples	n/a	4 (67 %)	3 (50 %)	4 (67 %)	4 (67 %)
	Median fold change compared to fresh cells	n/a	0.39	0.44	0.17	0.23
	Coefficient of correlation	n/a	0.92	0.93	0.87	0.78
IL-13	SFCs per 2 x 10 ⁵ PBMCs after deduction of unspecific background (mean \pm SD, p-value)	52.2 \pm 37.3	26.3 \pm 24.7 $p = 0.063$	37.6 \pm 49.6 $p = 0.443$	20.1 \pm 25.8 $p = 0.146$	8.8 \pm 11.7 $p = 0.018$
	SFCs per 2 x 10 ⁵ PBMCs in unstimulated wells (mean \pm SD)	33.2 \pm 32.5	12.8 \pm 12.9	71.2 \pm 39.4	15.3 \pm 11.7	13.7 \pm 9.8
	SFCs per 2 x 10 ⁵ PBMCs in lysate stimulated wells (mean \pm SD)	85.5 \pm 67.5	39.0 \pm 37.2	105.8 \pm 77.8	30.8 \pm 35.0	19.7 \pm 21.9
	Values exceeding the upper 95 % CI of fresh samples	n/a	0 (0 %)	2 (33 %)	1 (17 %)	0 (0 %)
	Values below the lower 95 % CI of fresh samples	n/a	4 (67 %)	3 (50 %)	5 (83 %)	5 (83 %)
	Median fold change compared to fresh cells	n/a	0.56	0.78	0.18	0.07
	Coefficient of correlation	n/a	0.76	0.63	0.17	0.85

IL-17	SFCs per 2 x 10 ⁵ PBMCs after deduction of unspecific background (mean ± SD, p-value)	23.6 ± 21.8	5.7 ± 3.3 p = 0.098	2.1 ± 3.8 p = 0.049	0.3 ± 0.4 p = 0.061	1.0 ± 1.7 p = 0.056
	SFCs per 2 x 10 ⁵ PBMCs in unstimulated wells (mean ± SD)	10.7 ± 15.3	3.6 ± 2.1	4.3 ± 2.4	2.0 ± 1.9	1.1 ± 1.8
	SFCs per 2 x 10 ⁵ PBMCs in lysate stimulated wells (mean ± SD)	34.3 ± 36.5	9.3 ± 4.4	5.8 ± 4.6	1.3 ± 0.9	1.3 ± 1.7
	Values exceeding the upper 95 % CI of fresh samples	n/a	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
	Values below the lower 95 % CI of fresh samples	n/a	3 (50 %)	5 (83 %)	5 (83 %)	5 (83 %)
	Median fold change compared to fresh cells	n/a	0.32	0.03	0.00	0.00
	Coefficient of correlation	n/a	0.66	0.87	0.39	0.86

Supplementary Table 4: Performance of ELISPOT based *A. fumigatus* specific T-cell quantification depending on pre-analytic treatment

3.2 Kapitel 2: Development of a simple and robust whole blood assay with dual co-stimulation to quantify the release of T-cellular signature cytokines in response to *Aspergillus* antigens.

Autorenliste:

Lauruschkat CD, Page L, White PL, Etter S, Davies HE, Duckers J, Ebel F, Schnack E, Backx M, Dragan M, Schlegel N, Kniemeyer O, Brakhage AA, Einsele H., Loeffler J #, Wurster S#.

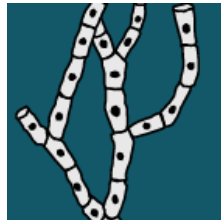
J Fungi (Basel). # geteilte Letztautorenschaft

Zwei von 92 Artikeln der Ausgabe 6 wurden mit Editor's Choice ausgezeichnet. Diese Publikation war eine davon.

Editor's Choice

Journal:

J Fungi (Basel). (EISSN 2309-608X)



Journal of
Fungi

Ausgabe:

2021 Jun 8;7(6):462. (a)

Doi:





<https://doi.org/10.3390/jof7060462>.

Sekundäre Veröffentlichung:

Die sekundäre Veröffentlichung findet mit der schriftlichen Genehmigung des Journals unter der CC BY-Lizenz (*Open Access*) statt.

Article

Development of a Simple and Robust Whole Blood Assay with Dual Co-Stimulation to Quantify the Release of T-Cellular Signature Cytokines in Response to *Aspergillus fumigatus* Antigens

Chris D. Lauruschkat ¹, Lukas Page ¹, P. Lewis White ², Sonja Etter ¹, Helen E. Davies ³, Jamie Duckers ⁴, Frank Ebel ⁵ , Elisabeth Schnack ⁵, Matthijs Backx ², Mariola Dragan ⁶, Nicolas Schlegel ⁶ , Olaf Kniemeyer ⁷, Axel A. Brakhage ⁷, Hermann Einsele ¹ , Juergen Loeffler ^{1,*} and Sebastian Wurster ^{8,*} 

- ¹ Department of Internal Medicine II, University Hospital of Wuerzburg, 97080 Wuerzburg, Germany; Lauruschka_c@ukw.de (C.D.L.); E_Page_L@ukw.de (L.P.); sonja.etter@stud-mail.uni-wuerzburg.de (S.E.); Einsele_H@ukw.de (H.E.)
 - ² Public Health Wales, Microbiology Cardiff, Wales CF14 4XW, UK; lewis.white@wales.nhs.uk (P.L.W.); Matthijs.backx2@wales.nhs.uk (M.B.)
 - ³ Department of Respiratory Medicine, University Hospital of Wales, Llandough Site, Cardiff CF64 2XX, UK; Helen.Davies30@wales.nhs.uk
 - ⁴ Cystic Fibrosis Unit, University Hospital of Wales, Llandough Site, Cardiff CF64 2XX, UK; Jamie.Duckers@wales.nhs.uk
 - ⁵ Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig-Maximilians-University of Munich, 80539 Munich, Germany; Frank.Ebel@micro.vetmed.uni-muenchen.de (F.E.); Elisabeth.Schnack@micro.vetmed.uni-muenchen.de (E.S.)
 - ⁶ Department of Surgery I, University Hospital of Wuerzburg, 97080 Wuerzburg, Germany; Dragan_M@ukw.de (M.D.); schlegel_n@ukw.de (N.S.)
 - ⁷ Department of Molecular and Applied Microbiology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology–Hans-Knöll-Institute (HKI), 07745 Jena, Germany; olaf.kniemeyer@hki-jena.de (O.K.); axel.brakhage@leibniz-hki.de (A.A.B.)
 - ⁸ Department of Infectious Diseases, Infection Control and Employee Health, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, USA
- * Correspondence: Loeffler_J@ukw.de (J.L.); stwurster@mdanderson.org (S.W.); Tel.: +49-931-201-36412 (J.L.); +1-713-563-1753 (S.W.)



Citation: Lauruschkat, C.D.; Page, L.; White, P.L.; Etter, S.; Davies, H.E.; Duckers, J.; Ebel, F.; Schnack, E.; Backx, M.; Dragan, M.; et al. Development of a Simple and Robust Whole Blood Assay with Dual Co-Stimulation to Quantify the Release of T-Cellular Signature Cytokines in Response to *Aspergillus fumigatus* Antigens. *J. Fungi* **2021**, *7*, 462. <https://doi.org/10.3390/jof7060462>

Academic Editor: George Deepe

Received: 20 April 2021

Accepted: 28 May 2021

Published: 8 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Deeper understanding of mold-induced cytokine signatures could promote advances in the diagnosis and treatment of invasive mycoses and mold-associated hypersensitivity syndromes. Currently, most T-cellular immunoassays in medical mycology require the isolation of mononuclear cells and have limited robustness and practicability, hampering their broader applicability in clinical practice. Therefore, we developed a simple, cost-efficient whole blood (WB) assay with dual α -CD28 and α -CD49d co-stimulation to quantify cytokine secretion in response to *Aspergillus fumigatus* antigens. Dual co-stimulation strongly enhanced *A. fumigatus*-induced release of T-cellular signature cytokines detectable by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or a multiplex cytokine assay. Furthermore, T-cell-dependent activation and cytokine response of innate immune cells was captured by the assay. The protocol consistently showed little technical variation and high robustness to pre-analytic delays of up to 8 h. Stimulation with an *A. fumigatus* lysate elicited at least 7-fold greater median concentrations of key T-helper cell signature cytokines, including IL-17 and the type 2 T-helper cell cytokines IL-4 and IL-5 in WB samples from patients with *Aspergillus*-associated lung pathologies versus patients with non-mold-related lung diseases, suggesting high discriminatory power of the assay. These results position WB-ELISA with dual co-stimulation as a simple, accurate, and robust immunoassay for translational applications, encouraging further evaluation as a platform to monitor host immunity to opportunistic pathogens.

Keywords: immunoassay; biomarker; *Aspergillus*; cytokines; inflammation; adaptive immunity

1. Introduction

Humans inhale hundreds of airborne conidia of the ubiquitous mold *Aspergillus fumigatus* daily, resulting in constant activation of the innate and adaptive immune system in order to clear the fungus from the lungs and maintain protective tolerance [1–3]. Imbalance of immunity can lead to a wide spectrum of *A. fumigatus*-associated diseases, ranging from invasive aspergillosis to hypersensitivity disorders [2]. As fine-tuning of the anti-*Aspergillus* response by T-cellular cytokines has major implications for protective immunity, recovery from invasive infection, and inflammatory immunopathology, deeper understanding of cytokine signatures may lead to advances in the diagnosis and treatment of invasive mycoses and mold-associated hypersensitivity syndromes [1,4–6].

Currently available investigational assays to quantify and analyze mold-specific T cells mostly rely on peripheral blood mononuclear cell (PBMC)-based flow cytometry or measurement of cytokine release via enzyme-linked immunospot (ELISPOT) and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) [7–11]. While showing potential as novel supportive biomarkers in medical mycology [7–11], PBMC-based assays have crucial drawbacks limiting their precision, robustness, and feasibility in a clinical setting [8,12,13]. These limitations include varying reproducibility, difficult protocol standardization, significant costs and hands-on-time, and the considerable impact of pre-analytical sample handling [12–14].

To overcome these drawbacks, there is a growing interest in the development of whole blood (WB)-based protocols to determine T-cell responses to fungal antigens [15,16], following the clinical success of WB-based tests in tuberculosis and cytomegalovirus (CMV) diagnostics and research [17–19]. Although WB assays are more robust than PBMC-based protocols [16], concerns about impaired test performance remain when stimulation conditions are suboptimal, e.g., in the presence of immunosuppressive therapy or after long pre-analytic delays [16,20–23]. Furthermore, most functional T-cell assays currently applied in the clinical routine are designed to specifically detect interferon gamma (IFN- γ) [24–27] and thus require optimization for reliable analysis of the complex cytokine milieu elicited by mold antigens. Prior work suggested differential robustness of individual T-helper cell subsets, with particularly poor reliability of type 17 T-helper cell (Th17) stimulation [28] and, consequently, quantification of IL-17 [12], a cytokine regarded as a cornerstone in both protective anti-*Aspergillus* immunity and inflammatory immunopathology [1].

Although not commonly employed in commercially available WB-ELISA kits and IFN- γ release assays (IGRAs), previous studies have highlighted that co-stimulatory antibodies can considerably increase the detection efficacy and robustness of functional T-cell readouts [29,30]. Specifically, we have shown in two recent studies that enhanced co-stimulation improves (flow cytometric) detection rates of mold-reactive T-cells while attenuating the detrimental impact of immunosuppressive pretreatment on assay performance [16,23]. Building upon these advances, we herein developed and tested a simple, cost-efficient WB-ELISA system with enhanced co-stimulation to quantify T-cellular signature cytokines in response to *A. fumigatus* antigens.

2. Materials and Methods

2.1. Blood Collection

Venous blood was obtained using Monovette®lithium heparin blood collection tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Exclusion criteria for healthy blood donors (age 18–50, 16 male, 7 female) were acute infections, pregnancy, as well as recent immunomodulatory or antimicrobial therapy. For studies in patients with chronic lung diseases, 2 patients with cystic fibrosis (CF) and elevated *Aspergillus*-specific immunoglobulin E (age 41–47, 1 male, 1 female), 3 patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA, age 33–83, 1 male, 2 female), 4 patients with chronic pulmonary aspergillosis (CPA, age 60–80, 3 male, 1 female), and 5 control patients with non-mold-related interstitial lung diseases (age 56–90, 4 male, 1 female) were enrolled at the University Hospital of Wales.

2.2. Generation of *Aspergillus fumigatus* mycelial lysate (AfuLy)

To generate *A. fumigatus* (ATCC46645) protein extracts, conidia (1×10^6 /mL) were inoculated in *Aspergillus* minimal medium [31] and cultured at 37 °C, 200 rpm, in shake flasks. Mycelium was harvested after 20 h by filtration through Miracloth (Merck Millipore Calbiochem, Darmstadt, Germany). Subsequently, frozen mycelium was ground in liquid nitrogen by using a mortar and pestle and resuspended in sterile PBS (approximately 100 mg ground mycelium in 1 mL of PBS). The crude extract was centrifuged for 15 min at $20,000 \times g$. Thereafter, the supernatant was transferred to a new microcentrifuge tube and stored at -80 °C until use. The protein concentration was determined using the infrared-based Direct Detect System (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). For selected experiments (Figures 1 and 5), a formerly commercially available lysate (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) was used instead.

2.3. Generation of Recombinant Aspf4

For recombinant expression of the *A. fumigatus* allergen Aspf4, the respective sequence (Afu2g03830, obtained from the *Aspergillus* Genome Database, <http://aspgd.org/>, accessed on 13 June 2019) was amplified from cDNA derived from *A. fumigatus* strain AfS35. PCR amplification was performed using Q5 High-fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany). The following oligonucleotide sequences were used: GCAGGATCCCACGAGCGCCGCCACCTCCAC (forward, BamHI restriction site underlined) and GCAAAGCTTCTACTCCTTGAGTCGAGGTT (reverse, HindIII restriction site underlined). The PCR amplicons were cloned into the expression vector pQE30 (Qiagen, Hilden, Germany) using the primer-derived restriction sites. After transformation into *E. coli* strain M15 pREP4 (Qiagen, Hilden, Germany), the recombinant proteins were purified using HisTalon gravity columns (Takara-Bio Inc., Kusatsu, Präfektur Shiga, Japan) according to the vendor's instructions.

2.4. Quality Control of Lysates and Aspf4 Antigen

Endotoxin concentrations in lysates and Aspf4 antigen preparations were determined using the Endochrome-K assay kit and EndoScan V software 4.0 (SP1) (Charles River Wilmington, MA, USA) according to the manufacturer's manual. A very conservative cut-off for endotoxin concentrations (1 endotoxin unit per mg of antigen) was applied to preclude an influence of endotoxin contamination on test results.

2.5. Preparation of WB Stimulation Tubes

Anticoagulant-free blood collection tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) were prepared with Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) or CTL Test™ medium (CTL Europe, Bonn, Germany) supplemented with co-stimulatory antibodies (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and antigenic stimuli, as outlined in Table 1. The unstimulated background control contained co-stimulatory factors and medium, but no stimulus. The positive control consisted of medium and phytohemagglutinin (PHA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Stimulation tubes were cryopreserved at -20 °C for up to four weeks.

2.9. Statistics

Antigen-specific cytokine release was determined by subtracting the cytokine concentrations in the unstimulated control tube from antigen-stimulated cytokine concentrations. All cytokine concentrations were then normalized per mL of the subject's blood volume injected into the stimulation tubes. To determine coefficients of variation (CVs), standard deviations were divided by mean values. In line with published recommendations [32], target CVs were 25% for well-defined antigens (Aspf4) and 35% for less well-defined antigens (AfuLy). GraphPad Prism v8 and Microsoft Excel were used for data analysis. Applicable significance tests are specified in the figure legends. Significance levels are denoted by asterisks: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

3. Results

3.1. Impact of Co-Stimulatory Factors on *Aspergillus*-Induced Cytokine Release

At first, we compared the stimulation efficacy of AfuLy without co-stimulation, with α -CD28, or α -CD28 combined with α -CD49d. Although not reaching statistical significance, α -CD28 alone resulted in 3.2-fold higher median IFN- γ response to the lysate compared with non-co-stimulated samples and was essential to elicit detectable IL-17 release in the majority of subjects tested (Figure 1a,b). Dual co-stimulation further increased median *A. fumigatus*-induced IFN- γ and IL-17 concentrations and led to enhanced release in 17 out of 20 individual measurements compared with both the non-co-stimulated protocol and α -CD28 alone (Figure 1a,b). In contrast, no influence of co-stimulation on background IFN- γ and IL-17 secretion (median 0–1 pg/mL for both cytokines and all 3 conditions) was seen in control samples not containing AfuLy.

To corroborate the impact of dual co-stimulation on a broader selection of cytokines and to confirm our findings with a different readout methodology, we used a 21-plex Luminex assay (Figure 1c,d). Mean concentrations of all studied T-helper cell signature cytokines except IL-4 were increased in samples with dual co-stimulation versus α -CD28 alone, with the strongest enhancement found for IL-5 and IL-17A (Figure 1c). Interestingly, concentrations of selected cytokines derived from antigen-presenting cells (APCs), especially MIP-1 α and IL-21, were also increased in plasma supernatants from tubes with dual co-stimulation (Figure 1d).

3.2. T-Cell Dependency of Immune Cell Stimulation

Next, we performed a more detailed assessment of AfuLy-induced leukocyte activation in our WB-ELISA stimulation system. As extensively documented elsewhere [16,23], AfuLy-stimulation of WB with dual co-stimulation facilitates sensitive detection of *Aspergillus*-reactive T-helper cells by intracellular staining of activation markers (e.g., CD69 or CD154), even in healthy donors with moderate mold exposure (representative donor shown in Figure 2a). Importantly, activation of natural killer (NK) cells and natural killer T (NKT) cells by AfuLy was minimal, as evidenced by minor changes in CD107a and IFN- γ expression compared with unstimulated cells (Figure 2a–c). These results suggest that NK cells and NKT cells are not major confounders of IFN- γ quantification in our system.

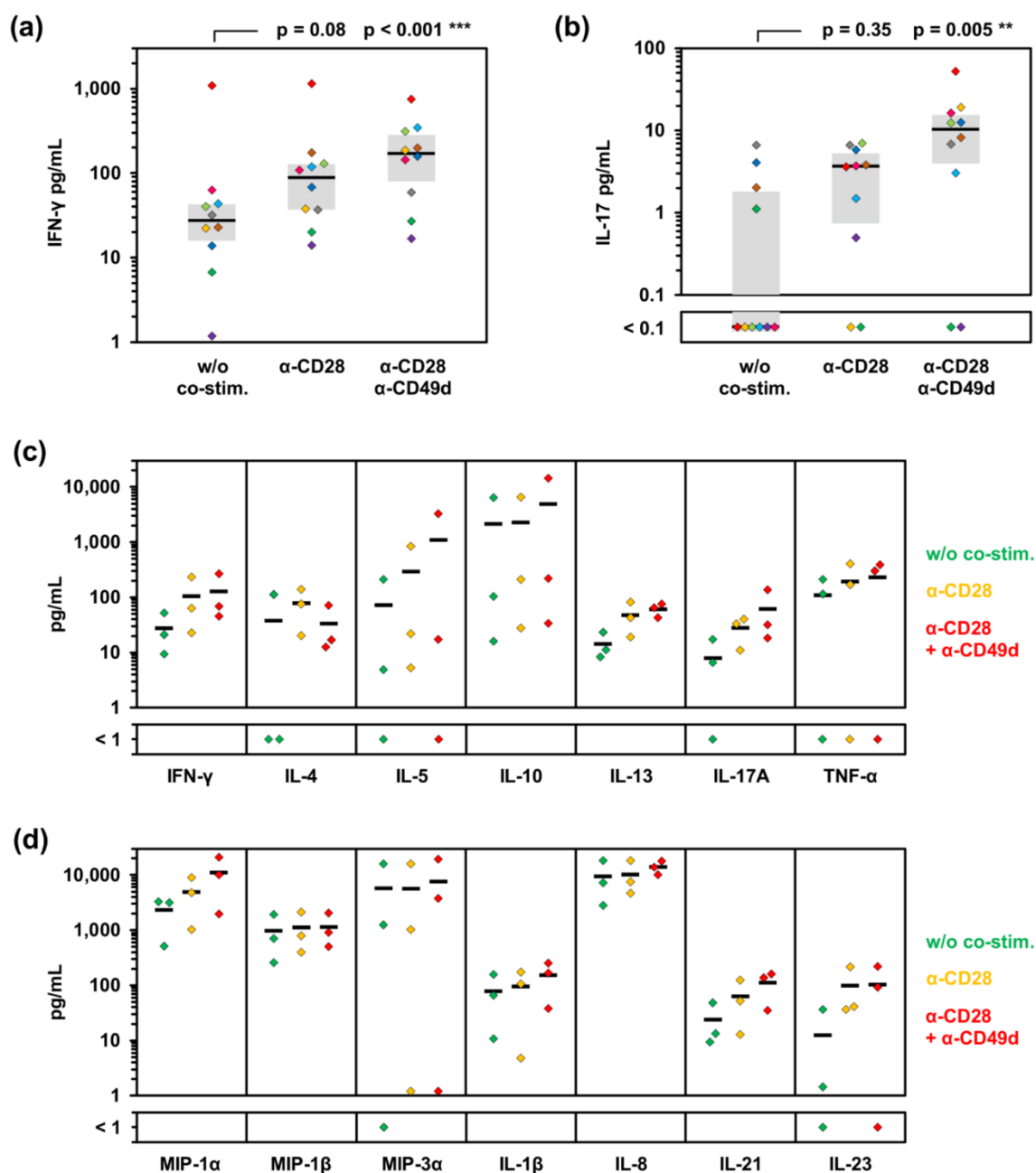


Figure 1. Impact of co-stimulatory factors on *A. fumigatus* lysate-induced cytokine secretion. (a,b) WB from 10 highly mold-exposed subjects, as defined in References [3,33], was stimulated for 24 h with AfuLy in RPMI-supplemented test tubes containing α -CD28, α -CD28 plus α -CD49d, or no co-stimulatory factors (w/o co-stim.). IFN- γ (a) and IL-17 (b) concentrations were quantified in plasma supernatants by ELISA. For all results shown, the unspecific background, determined in a test tube containing the respective co-stimulation cocktail but no lysate, was deduced from antigen-induced cytokine concentrations. Corresponding test results from each donor are indicated by the same color. The Friedman test and Dunn’s multiple comparison test were used for significance testing. (c,d) WB samples from 3 additional healthy donors were stimulated as described above. Cytokine concentrations in plasma supernatants were quantified using a 21-plex Luminex assay. Individual background-adjusted concentrations of T-cellular signature cytokines (c) and selected cytokines predominantly produced by antigen-presenting cells (d) are shown. Black bars indicate means.

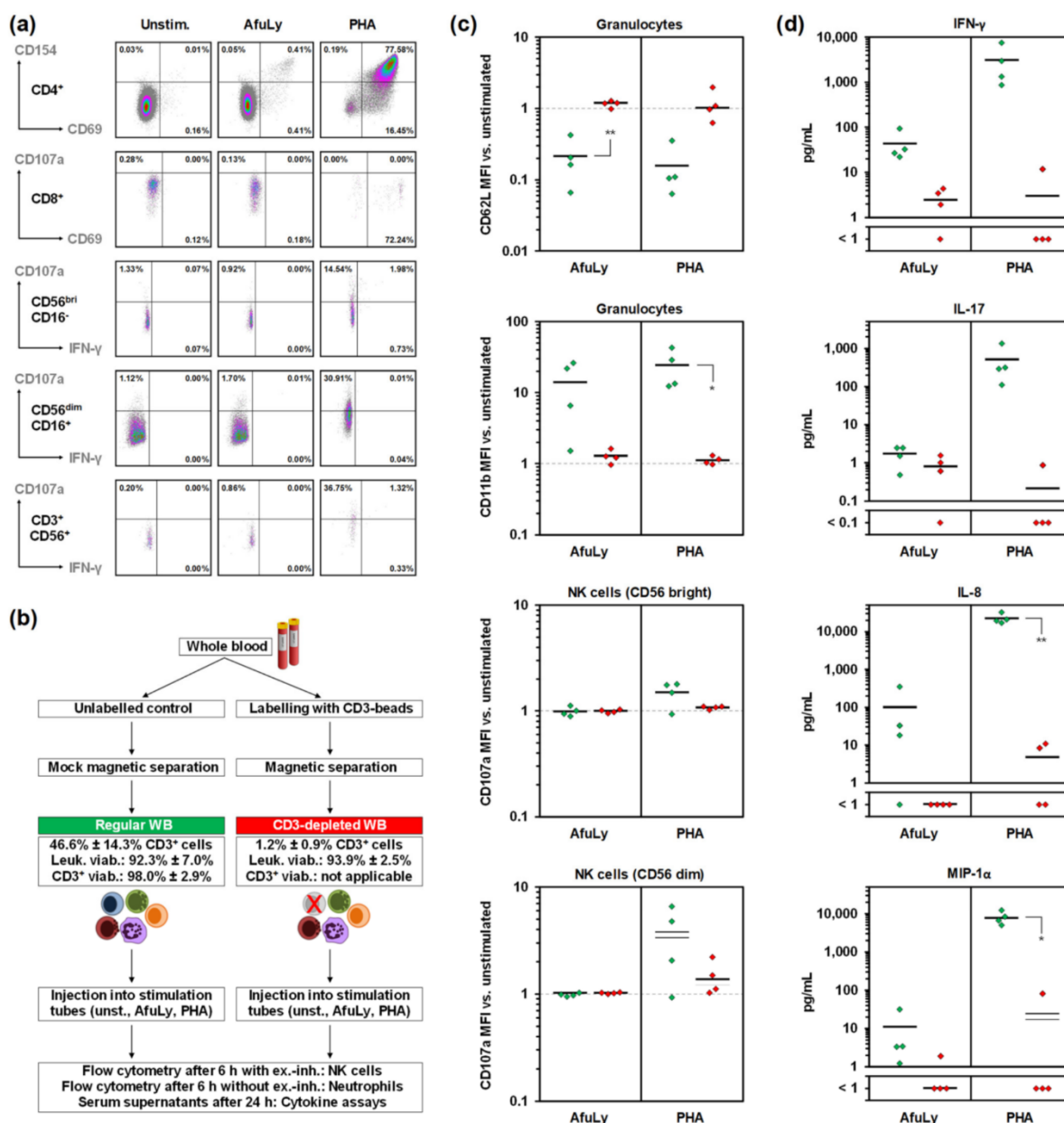


Figure 2. T-cell-dependent immune cell activation and cytokine release in WB-ELISA stimulation tubes. (a) Representative flow cytometry panels showing the expression of key activation markers (CD69, CD154, and/or CD107a) and IFN- γ by unstimulated, AfuLy-stimulated, and PHA-stimulated CD4⁺ T-helper cells, CD8⁺ cytotoxic T-cells, cytokine-producing CD56^{bright}CD16⁻ NK cells, cytotoxic CD56^{dim}CD16⁺ NK cells, and CD3⁺CD56⁺ NKT cells, as determined by intracellular staining. (b) Flowchart of experimental procedures to determine the T-cell dependency of activation marker expression and cytokine response by comparison of regular and CD3-depleted WB. Ranges of CD3⁺ cell frequencies among leukocytes and leukocyte viability after magnetic bead-based CD3 depletion and mock depletion are provided. (c) Relative expression of the degranulation marker CD62L and activation marker CD11b on granulocytes and CD107a expression of NK cells upon AfuLy and PHA stimulation of regular (green) and CD3-depleted (red) WB, normalized to unstimulated cells. (d) Background-adjusted concentrations of IFN- γ , IL-17, IL-8, and MIP-1 α (CCL3) in plasma supernatants of regular (green) and CD3-depleted (red), AfuLy- and PHA-stimulated WB. (c,d) Paired two-sided t-test; $n = 4$. Black bars indicate means. Abbreviations: AfuLy = *A. fumigatus* mycelial lysate, ex.-inh. = exocytosis inhibitors, Leuk. = leukocyte, MFI = mean fluorescence intensity, PHA = Phytohaemagglutinin, unst. = unstimulated, viab. = viability, WB = whole blood.

In order to further verify T-cell specificity of antigen-induced leukocyte activation and cytokine release, we compared the response of regular and T-cell-depleted WB to AfuLy and PHA (Figure 2b). T-cell depletion by magnetic separation of CD3⁺ T cells was highly effective (>95% reduction in CD3⁺-cell content) and leukocyte viability remained high (Figure 2b). Of note, both AfuLy and PHA elicited activation (CD11b upregulation) and degranulation (loss of CD62L) of granulocytes; however, these responses were strongly dependent on the presence of T-cells (Figure 2c). In contrast to AfuLy, PHA was able to induce CD107a upregulation in both CD16^{bright} and CD16^{dim} NK cells, albeit NK-cell activation was largely T-cell-dependent (Figure 2c).

Expectedly, depletion of CD3 cells markedly lowered the release of T-helper-cell signature cytokines IFN- γ and IL-17 in response to AfuLy and PHA (Figure 2d). Although not reaching significance due to inter-individual baseline variation in cytokine release, these data further underscore the T-cell specificity of these cytokines in our assay system. Notably, CD3-depletion also strongly abrogated the AfuLy- and PHA-induced release of IL-8 and MIP-1 α (CCL3), key indicator cytokines for the activation of neutrophils and mononuclear phagocytes [34–37]. Altogether, these results suggest that WB-ELISA with dual co-stimulation captures both *A. fumigatus*-induced T-cell activation and T-cell/APC feedback loops, while providing a highly T-cell-dependent stimulation environment.

3.3. Evaluation of Assay Reproducibility

Assay precision is a crucial performance indicator for cellular biomarkers [38]. Therefore, we evaluated the CVs of T-cellular cytokine concentrations in two independent stimulation tubes injected by the same operator (technical CV) as well as the concordance of tests conducted by two operators using blood from the same venipuncture (inter-operator CV). Both parameters were very low (median 4.3–13.2%) for IFN- γ release induced by *A. fumigatus* antigens, indicating excellent reproducibility (Figure 3). For IL-17, slightly higher variability was seen; however, median technical and inter-operator CVs (7.7–13.6%) were markedly below commonly accepted thresholds for diagnostic bioassays (Figure 3) [39].

As the intra-individual fluctuation of immune responses to constantly encountered fungal aero-antigens presents an additional source of variation in functional T-cell biomarkers [3,40], we further compared the consistency of *A. fumigatus*-induced IFN- γ and IL-17 secretion in repeated samplings from the same donors after >4 weeks. Considering both antigens and cytokines, the intra-individual CVs ranged from 0.1% to 69.8%, with more than half (10/16) of the antigen/cytokine pairs showing intra-individual CVs below 15% (Figure 3).

3.4. Susceptibility to Pre-Analytic Delays

Subsequently, we tested the performance of our WB-ELISA protocol after pre-analytic delays, a major limitation of antigen-reactive T-cell assays [13,20,21]. AfuLy- and Asp4-induced IFN- γ and IL-17 secretion were highly robust after 4 and 8 h storage of injected stimulation tubes at room temperature prior to entering the regular 37 °C incubation cycle, with only 1 out of 16 individual measurements for each time point showing a >2-fold deviation from the immediately processed baseline sample (Figure 4). While leading to slightly greater deviations on average, even 24 h pre-incubation in the stimulation tube resulted in 7 out of 8 valid measurements for each cytokine (Figure 4). In contrast, a considerable number of >2-fold deviations from the baseline measurement were seen, particularly after 24 h, when blood was stored in heparinized blood collection tubes instead of being immediately injected into the stimulation tubes (Figure 4).

3.5. Application of WB-ELISA in Patients with *Aspergillus* Sensitization

We then sought to evaluate the performance of WB-ELISA in patients with *Aspergillus*-associated lung pathologies that are etiologically linked to an aberrant cytokine milieu, disproportionate T-cell activation, and pathologically elevated IL-17 secretion [1,41–43]. To that end, we tested the capability of the assay to discriminate cytokine concentrations

in antigen-stimulated WB samples taken from patients with cystic fibrosis (CF), allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), or chronic pulmonary aspergillosis (CPA), and control patients who had non-mold-related chronic interstitial lung diseases (Figure 5).

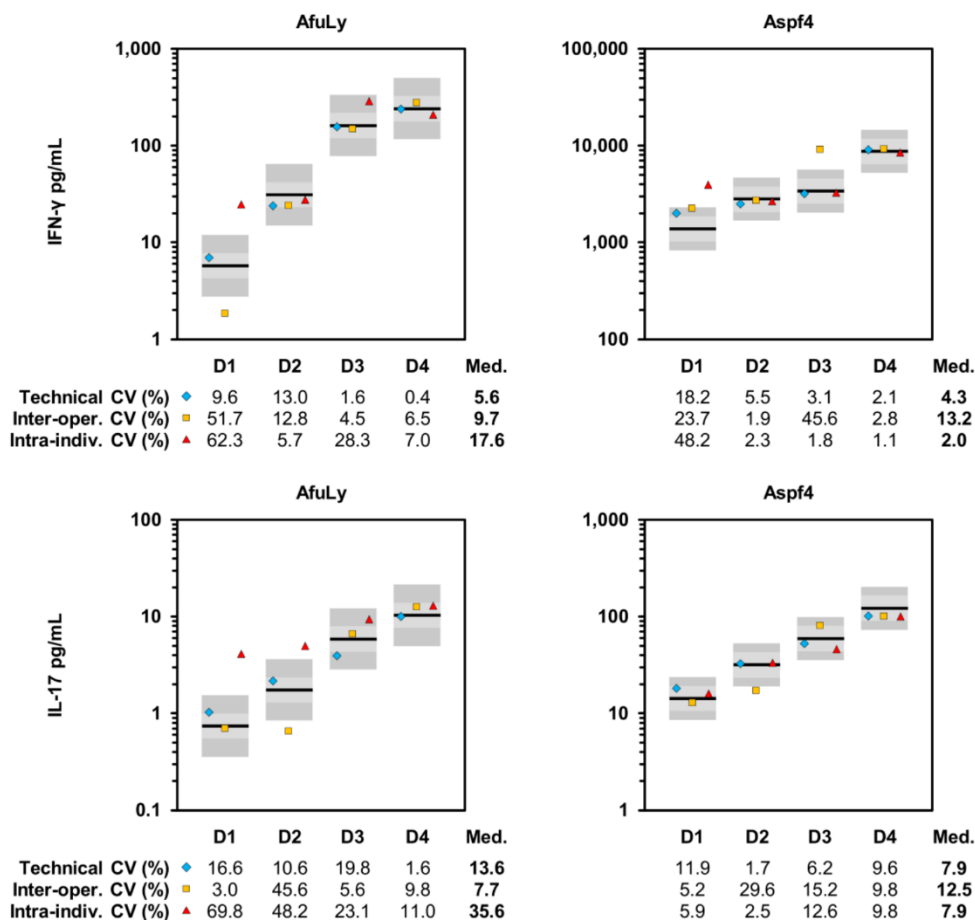


Figure 3. Technical and intra-individual variation of WB-ELISA. WB samples from 4 highly mold-exposed healthy subjects were stimulated with AfuLy or Aspf4 using RPMI-supplemented, α -CD28-, and α -CD49d-containing stimulation tubes as described in the Materials and Methods Section. After 24 h of stimulation, IFN- γ and IL-17 concentrations in plasma supernatants were quantified by ELISA. Individual results are indicated by black bars. For each donor and antigen (including the unspecific background control), a second set of stimulation tubes was prepared by the same operator using the same blood sample to determine technical variation (light blue diamonds). In addition, another set of stimulation tubes was injected by a different operator using blood from the same venipuncture to determine the inter-operator variation (yellow squares). Another blood draw was performed from the same subjects after a period of at least 4 weeks and cytokine concentrations (red triangle) were compared with the initial measurement (black bar) to calculate the intra-individual variation. All donors had reported no change of mold exposure profiles since the initial sampling based on our published questionnaire [33]. Colored boxes indicate the maximum range allowing for a CV of 15% (light grey) and 25% for defined protein antigens (Aspf4) or 35% for the lysate [32], respectively (dark grey). Abbreviations: AfuLy = *A. fumigatus* mycelial lysate, CV = coefficient of variation, D = donor, inter-oper. = inter-operator, intra-indiv. = intra-individual, Med. = median, WB = whole blood.

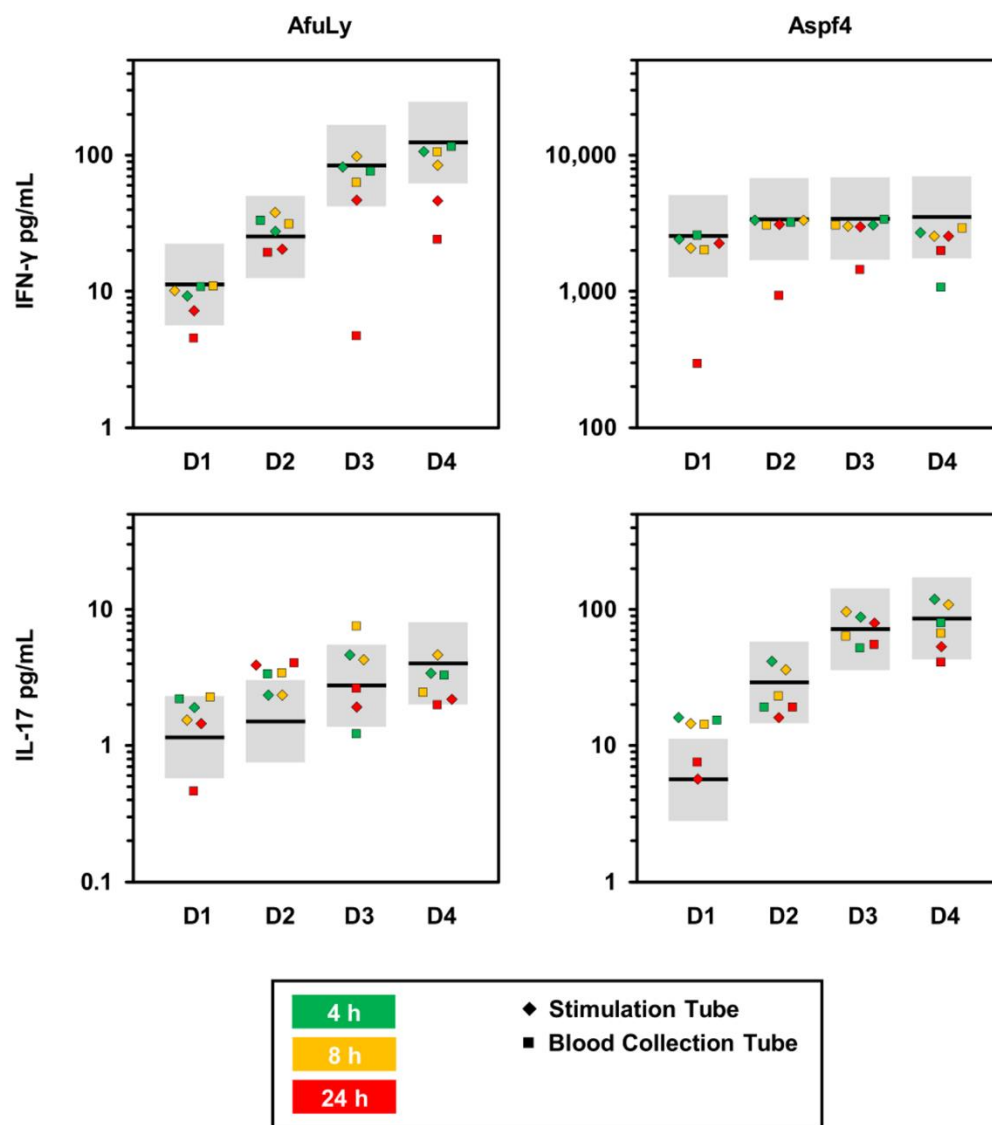


Figure 4. Robustness of WB-ELISA to pre-analytic delays. WB samples from 4 highly mold-exposed healthy donors were stimulated for 24 h with AfuLy or AspF4 using RPMI-supplemented, α -CD28-, and α -CD49d-containing stimulation tubes, as described in the Materials and Methods Section. IFN- γ and IL-17 concentrations in plasma supernatants were quantified by ELISA. WB was injected and incubated at 37 °C either immediately (black bars) or after pre-analytic storage at room temperature for 4 (green squares), 8 (yellow squares), or 24 h (red squares). In addition, immediately injected stimulation tubes were kept at room temperature for 4 (green diamonds), 8 (yellow diamonds), or 24 h (red diamonds) prior to being transferred to 37 °C for another 24 h incubation period. Individual background-corrected cytokine concentrations for each condition are shown. Grey boxes indicate a ± 2 -fold change compared with the immediately incubated control sample. Abbreviations: AfuLy = *A. fumigatus* mycelial lysate, WB = whole blood.

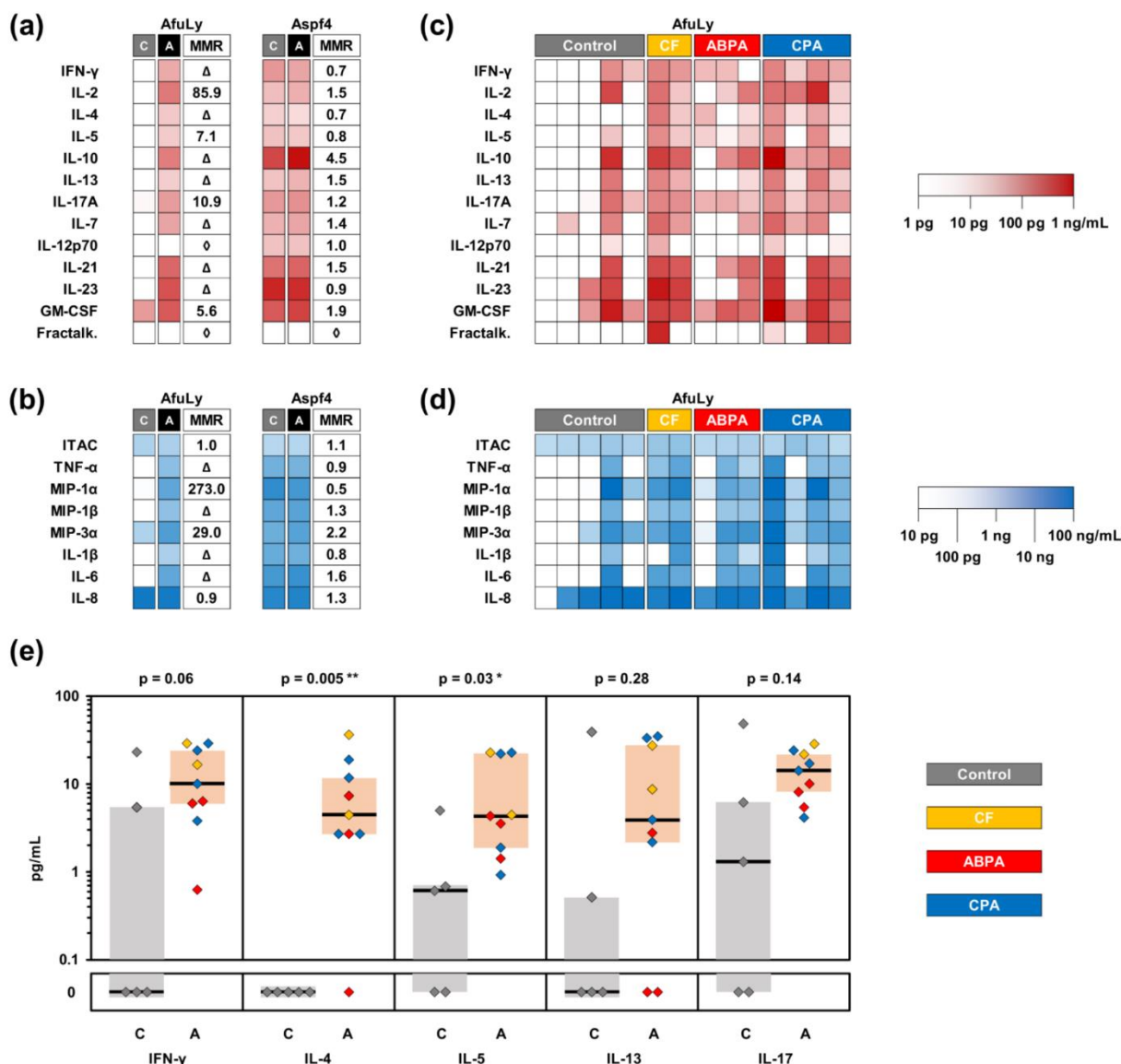


Figure 5. Comparison of *Aspergillus*-induced cytokine release in patients with *Aspergillus*-associated lung pathologies and other chronic lung diseases. WB from 9 patients with *Aspergillus*-associated lung pathologies (2 CF with *A. fumigatus* sensitization, 3 ABPA, and 4 CPA) and a control group of 5 patients with other chronic lung diseases was stimulated with AfuLy or Aspf4 using the RPMI-supplemented, α -CD28-, and α -CD49d-containing stimulation tubes, as described in the Materials and Methods Section. Cytokine concentrations in plasma supernatants were quantified using a 21-plex Luminex assay. (a,b) Heat maps indicating median background-adjusted cytokine concentrations in the ABPA/CF/CPA patient cohort "A" and control cohort "C" depending on the antigen used for stimulation. The numeric value in the MMR column represents the median-to-median ratio between the two cohorts, with values > 1.0 indicating greater median cytokine concentrations in the ABPA/CF/CPA cohort. Δ denotes infinite median-to-median ratios (median = 0 pg/mL in the control cohort). \diamond denotes undefined median-to-median ratios (median = 0 pg/mL in both cohorts). (c,d) Heat maps summarizing individual cytokine response to AfuLy in all 14 patients. (e) Comparison of individual AfuLy-induced concentrations of selected T-helper cell signature cytokines. Medians and interquartile ranges for patients with ABPA/CF/CPA ("A", red) and controls ("C", grey) are indicated by black bars and colored boxes, respectively. Two-sided Mann-Whitney U test. Abbreviations: AfuLy = *A. fumigatus* mycelial lysate, ABPA = allergic bronchopulmonary aspergillosis, CF = cystic fibrosis, CPA = chronic pulmonary aspergillosis, Fractalk. = fractalkine, WB = whole blood.

We compared WB stimulation with AfuLy and the proteinaceous *A. fumigatus* antigen Asp4 and assessed plasma supernatants with a 21-plex cytokine assay (Figure 5a,b). The lysate provided a stronger discriminatory power between the two cohorts than Asp4, with median-to-median ratios of at least 7.1 for all T-helper cell signature cytokine responses tested (Figure 5c). Several T-cellular signature cytokines displayed non-overlapping interquartile ranges of concentrations in AfuLy-stimulated samples from patients with *Aspergillus*-associated diseases and controls (Figure 5e). In addition to an increased IL-17 response to the lysate in CF/ABPA/CPA patients (median, 14.3 versus 1.3 pg/mL in controls), significantly greater induction of the Th2 cytokines IL-4 and IL-5 was found in samples from patients with *Aspergillus*-associated lung diseases (Figure 5e). This observation was corroborated by a trend toward elevated IL-13 levels, another Th2 cytokine linked to allergic airway inflammation [44,45], in samples from CF/ABPA/CPA patients. APC-derived cytokines such as MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , IL-1 β , and IL-6 were also strongly upregulated in AfuLy-stimulated blood from patients with *Aspergillus*-associated lung pathologies compared to controls (Figure 5b,d). In contrast, Asp4 failed to discriminate T-cellular and APC-derived cytokine endpoints between the two cohorts (Figure 5a,b). Background-adjusted raw data for all patients and both stimuli are provided in Supplementary Tables S2 (AfuLy) and S3 (Asp4).

4. Discussion

There is increasing interest in WB-based profiling of adaptive immune responses in infectious diseases and, to that end, a number of investigational and commercial assay systems have been developed [17,46]. WB assays for the detection of antigen-reactive T-cells have several important advantages over their PBMC-based counterparts as they require less blood volume and hands-on-time, facilitate improved standardization, and are often more cost-efficient [47–49]. WB also provides a more physiological representation of the in vivo environment, since individual immune cell ratios, granulocytes, and platelets are preserved [47,48]. Of note, granulocytes are important activators of secondary stimulation loops and are known to shape phenotypes of adaptive cellular immunity [50]. Accordingly, we and others reported greater stimulatory capacity and improved reproducibility of WB-based protocols compared with conventional PBMC assays [16,47,49,50]. The present study corroborated these observations by providing direct evidence for T-cell-dependent granulocyte activation and release of APC-derived cytokines in our WB-ELISA stimulation tubes (Figure 2c,d).

Mold-reactive T-cell assays tend to be particularly susceptible to suboptimal stimulation conditions [11,12], likely due to the heterogeneity of reactive T-cell subsets, complex antigenic stimuli, and pivotal contributions of Th2 and Th17 cells [1], which are less robust and demonstrate delayed activation kinetics [51]. To tackle these challenges, we recently highlighted the crucial role of enhanced co-stimulation to improve the efficacy and robustness of flow cytometric mold-reactive T-cell detection, especially after exposure to immunosuppressive agents [16,23]. In line with these reports, α -CD28 addition noticeably yet non-significantly boosted cytokine secretion in our WB-ELISA system, whereas dual co-stimulation with both α -CD49d and α -CD28 was essential to maximize *A. fumigatus*-reactive IFN- γ and IL-17 release. These findings were confirmed by magnetic multiplex cytokine profiling, which revealed improved detection rates for most of the studied T-cellular cytokines as well as various APC cytokines (e.g., IL-1 β and MIP-1 α), suggesting that (dual) co-stimulation also enhances T-cell/APC feedback loops.

Although CD28 and CD49d can drive T-cell activation and viability, enhance cytokine secretion, and improve assay performance [29,30,52–55], to our knowledge, none of the commercial IGRAs routinely use co-stimulatory antibodies, likely due to concerns over non-specific background reactivity. However, concordant with our flow cytometry-based experience [16] and other reports [53,56], non-specific background secretion of T-cellular cytokines was minimal in our optimized ELISA system and remained unchanged with dual co-stimulation.

Technical and inter-operator variation of WB-ELISA was low and within commonly accepted thresholds for cell-based bioassays [32,39]. Additionally, the WB-ELISA protocol showed superior robustness to pre-analytic delays compared with previously published data for PBMC-based assays (including ELISA) to detect *A. fumigatus*-specific T-cell activation [12,13]. A recent study by our consortium further revealed an overall promising performance of WB-ELISA in allogenic hematological stem cell transplant recipients [57]. Specifically, high technical reliability and good concordance of IFN- γ response to CMV phosphoprotein 65 with CMV serostatus and reactivation was seen in patients with >800 lymphocytes per μ L of peripheral blood. Combined with the present study, these results indicate high assay robustness using antigens with varying complexity and different T-cell activation kinetics.

Importantly, blood samples stored in conventional heparinized blood collection tubes prior to injection were more susceptible to long pre-analytic delays, underscoring a protective role of medium supplementation and dual co-stimulation to maintain T-cell viability and functionality. Consequently, blood should be injected into the stimulation system immediately after the blood draw, a process that is similar to the injection of blood culture flasks [16]. The injected stimulation tubes could then be transported to adequate laboratory facilities at room temperature during an 8-h window, if onsite incubation or temperature-controlled transportation are not available.

While evaluation of the diagnostic performance in invasive aspergillosis is needed in future, sufficiently powered multi-center studies, we applied our optimized WB-ELISA to patients with a spectrum of chronic *Aspergillus*-associated lung pathologies that frequently lead to altered T-cell response to mold antigens and enhanced release of Th2 and Th17 signature cytokines. Specifically, increased IL-17 response has been associated with chronic lung diseases that predispose to airway colonization by molds including *Aspergillus* [58,59] and can promote fungal persistence and tissue inflammation [1,60]. Accordingly, our WB-ELISA assay revealed increased, AfuLy-induced, IL-17 release in most patients with CF, ABPA, or CPA. Although statistical significance was not reached for IL-17 due to the small sample size, our finding of an over 10-fold median-to-median ratio and non-overlapping interquartile ranges suggests high discriminatory power of the optimized ELISA assay that could surpass the discriminatory potential of intracellular IL-17 staining [58,61].

Interestingly, our results also indicated notable elevation of Th2 cytokines IL-4, IL-5, and IL-13 in ABPA/CF/CPA patients versus controls. This observation is consistent with a murine study suggesting that chronic or repeated exposure to *Aspergillus* induces co-evolution of Th1, Th2, and Th17 cells [62]. Furthermore, PBMCs from patients with acute ABPA stimulated with *Aspergillus* antigens have been reported to show enhanced Th2 cytokine response, resulting in an increased Th2/Th1 ratio [63,64]. However, in line with earlier reports [3,33,58,65], considerable induction of T-helper cell signature cytokines by AfuLy was also identified in some of our control patients (Figure 5E) and healthy subjects with frequent mold exposure (Figures 1–4). Future studies would be warranted to determine the usefulness of WB-ELISA to track occupational or residential mold exposure and to elucidate the influence of environmental mold exposure on the assay's diagnostic performance in both invasive mold infections and hypersensitivity syndromes.

Our study had several limitations. Firstly, the only commercially available T-cell-optimized, research-grade *A. fumigatus* lysate (Miltenyi Biotec) was recently discontinued, and the in-house lysate does not provide comparably consistent stimulation efficiency. Differences in stimulation capacity were also observed amongst different batches of AspF4 antigens. Although this limits comparability between experimental series, it does not represent an inherent limitation of the WB-ELISA technique per se. However, commercial availability of quality-controlled and cost-efficient mold antigens would be essential in order to improve the standardization of functional T-cell assays across different laboratories. Secondly, our enhanced WB-ELISA assay displayed heightened sensitivity to residual endotoxins in antigen preparations. This necessitated enhanced, industry-grade purification of antigenic stimuli in order to reduce the residual endotoxin content below 1

endotoxin unit per mg of antigen and may limit the selection of applicable infection-related antigens for future studies. Thirdly, as is the case for blood culture bottle inoculation, this assay requires a strictly aseptic venipuncture technique and thorough disinfection of the membrane of the stimulation tube, since the test is susceptible to microbial contamination. Lastly, the patient cohort for validation of the assay in the present study was limited in size and did not cover patients with proven or probable invasive aspergillosis due to a lack of appropriate samples. Nonetheless, the technical reliability and high discriminatory power observed in the present study and the solid performance of our WB-ELISA system in allogeneic stem cell transplant recipients [57] encourage future multi-center evaluation in immunocompromised patients.

5. Conclusions

We have developed a cost-efficient, small-volume WB-ELISA system with enhanced co-stimulation that facilitates robust yet specific detection of T-helper cell signature cytokines and T-cell-dependent APC activation in response to *Aspergillus* antigens. Our results indicate good reproducibility and resilience to pre-analytic delays of up to 8 h. Our proof-of-concept study demonstrates high concordance of *Aspergillus*-reactive cytokine signatures with the etiology of chronic lung pathologies. Collectively, these data encourage the future evaluation of WB-ELISA as a platform to develop supportive immune surveillance strategies for opportunistic infections or mold-reactive hypersensitivity syndromes.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof7060462/s1>. Table S1: Antibodies used for flow cytometric studies. Table S2: Raw data for AfuLy-induced cytokine release (in pg/mL) in samples from patients with *Aspergillus*-associated lung pathologies and other chronic lung diseases. Table S3: Raw data for AspF4-induced cytokine release (in pg/mL) in samples from patients with *Aspergillus*-associated lung pathologies and other chronic lung diseases.

Author Contributions: Conceptualization, C.D.L., F.E., J.L. and S.W.; methodology, C.D.L., L.P., E.S., J.L. and S.W.; investigation, C.D.L., L.P., S.E., E.S., M.B., M.D. and O.K.; resources, O.K. and A.A.B.; data curation, C.D.L., P.L.W., J.D., H.E.D. and S.W.; formal analysis, C.D.L. and S.W.; writing—original draft preparation, C.D.L. and S.W.; writing—review and editing, P.L.W., H.E.D. and J.L.; visualization, S.W.; supervision, N.S., H.E., J.L. and S.W.; project administration, J.L.; funding acquisition, H.E. and J.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the “Deutsche Forschungsgemeinschaft” (Collaborative Research Center/Transregio 124 “Pathogenic fungi and their human host: Networks of interaction—FungiNet”; DFG project number 210879364; project A2 to H.E. and J.L. and project A1 to A.A.B.) and by the Bavarian Ministry of Economics, Media, Energy and Technology (grant number BayBIO-1606-003, “T-cell based diagnostic monitoring of invasive aspergillosis in hematological patients” to J.L.).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committees of the University of Wuerzburg (protocol codes 34/15; 9/3/2015 and 178/16; 18/12/2018) and the National Health Service, Health Research Authority (REC reference 19/SC/0645; 07/01/2020).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all patients and healthy donors involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

Acknowledgments: We would like to thank all blood donors for their voluntary support of the study.

Conflicts of Interest: The authors have no conflicts of interest related to this study.

References

- Dewi, I.; van de Veerdonk, F.; Gresnigt, M. The Multifaceted Role of T-Helper Responses in Host Defense against *Aspergillus fumigatus*. *J. Fungi* **2017**, *3*, 55. [[CrossRef](#)]
- Park, S.J.; Hughes, M.A.; Burdick, M.; Strieter, R.M.; Mehrad, B. Early NK cell-derived IFN- γ is essential to host defense in neutropenic invasive aspergillosis. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 4306–4312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wurster, S.; Weis, P.; Page, L.; Helm, J.; Lazariotou, M.; Einsele, H.; Ullmann, A.J. Intra- and inter-individual variability of *Aspergillus fumigatus* reactive T-cell frequencies in healthy volunteers in dependency of mould exposure in residential and working environment. *Mycoses* **2017**, *60*, 668–675. [[CrossRef](#)]
- Jolink, H.; Hagedoorn, R.S.; Lagendijk, E.L.; Drijfhout, J.W.; van Dissel, J.T.; Falkenburg, J.H.; Heemskerk, M.H. Induction of *A. fumigatus*-specific CD4-positive T cells in patients recovering from invasive aspergillosis. *Haematologica* **2014**, *99*, 1255–1263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lordan, J.L.; Bucchieri, F.; Richter, A.; Konstantinidis, A.; Holloway, J.W.; Thornber, M.; Puddicombe, S.M.; Buchanan, D.; Wilson, S.J.; Djukanovic, R.; et al. Cooperative effects of Th2 cytokines and allergen on normal and asthmatic bronchial epithelial cells. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 407–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zelante, T.; De Luca, A.; Bonifazi, P.; Montagnoli, C.; Bozza, S.; Moretti, S.; Belladonna, M.L.; Vacca, C.; Conte, C.; Mosci, P.; et al. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, 2695–2706. [[CrossRef](#)]
- Bacher, P.; Steinbach, A.; Kniemeyer, O.; Hamprecht, A.; Assenmacher, M.; Vehreschild, M.J.G.T.; Vehreschild, J.J.; Brakhage, A.A.; Cornely, O.A.; Scheffold, A. Fungus-Specific CD4+ T Cells for Rapid Identification of Invasive Pulmonary Mold Infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2015**, *191*, 348–352. [[CrossRef](#)]
- Koehler, F.C.; Cornely, O.A.; Wisplinghoff, H.; Schauss, A.C.; Salmanton-Garcia, J.; Ostermann, H.; Ziegler, M.; Bacher, P.; Scheffold, A.; Alex, R.; et al. Candida-Reactive T Cells for the Diagnosis of Invasive Candida Infection-A Prospective Pilot Study. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1381. [[CrossRef](#)]
- Potenza, L.; Vallerini, D.; Barozzi, P.; Riva, G.; Forghieri, F.; Beauvais, A.; Beau, R.; Candoni, A.; Maertens, J.; Rossi, G.; et al. Characterization of specific immune responses to different *Aspergillus* antigens during the course of invasive Aspergillosis in hematologic patients. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e74326. [[CrossRef](#)]
- Potenza, L.; Vallerini, D.; Barozzi, P.; Riva, G.; Gilioli, A.; Forghieri, F.; Candoni, A.; Cesaro, S.; Quadrelli, C.; Maertens, J.; et al. Mucorales-Specific T Cells in Patients with Hematologic Malignancies. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0149108. [[CrossRef](#)]
- Steinbach, A.; Cornely, O.A.; Wisplinghoff, H.; Schauss, A.C.; Vehreschild, J.J.; Rybniker, J.; Hamprecht, A.; Richter, A.; Bacher, P.; Scheffold, A.; et al. Mould-reactive T cells for the diagnosis of invasive mould infection-A prospective study. *Mycoses* **2019**, *62*, 562–569. [[CrossRef](#)]
- Lauruschkat, C.D.; Wurster, S.; Page, L.; Lazariotou, M.; Dragan, M.; Weis, P.; Ullmann, A.J.; Einsele, H.; Loeffler, J. Susceptibility of *A. fumigatus*-specific T-cell assays to pre-analytic blood storage and PBMC cryopreservation greatly depends on readout platform and analytes. *Mycoses* **2018**, *61*, 549–560. [[CrossRef](#)]
- Wurster, S.; Weis, P.; Page, L.; Lazariotou, M.; Einsele, H.; Ullmann, A.J. Quantification of *A. fumigatus*-specific CD154+ T-cells-preanalytic considerations. *Med. Mycol.* **2017**, *55*, 223–227. [[CrossRef](#)]
- McKenna, K.C.; Beatty, K.M.; Vicetti Miguel, R.; Bilonick, R.A. Delayed processing of blood increases the frequency of activated CD11b+ CD15+ granulocytes which inhibit T cell function. *J. Immunol. Methods* **2009**, *341*, 68–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rubio-Carrasquilla, M.; Santa, C.D.; Rendon, J.P.; Botero-Garces, J.; Guimaraes, A.J.; Moreno, E.; Cano, L.E. An interferon gamma release assay specific for *Histoplasma capsulatum* to detect asymptomatic infected individuals: A proof of concept study. *Med. Mycol.* **2019**, *57*, 724–732. [[CrossRef](#)]
- Weis, P.; Helm, J.; Page, L.; Lauruschkat, C.D.; Lazariotou, M.; Einsele, H.; Loeffler, J.; Ullmann, A.J.; Wurster, S. Development and evaluation of a whole blood-based approach for flow cytometric quantification of CD154+ mould-reactive T cells. *Med. Mycol.* **2020**, *58*, 187–196. [[CrossRef](#)]
- Douglas, A.P.; Yu, L.; Sundararajan, V.; Szer, J.; Ritchie, D.; Slavin, M.A.; Sasadeusz, J.; Visvanathan, K. The QuantiFERON Monitor((R)) assay is predictive of infection post allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* **2020**, *22*, e13260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Silveira, M.B.V.; Ferrarini, M.A.G.; Viana, P.O.; Succi, R.C.; Terreri, M.T.; Costa-Carvalho, B.; Carlesse, F.; de Moraes-Pinto, M.I. Contribution of the interferon-gamma release assay to tuberculosis diagnosis in children and adolescents. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **2018**, *22*, 1172–1178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Theel, E.S.; Hilgart, H.; Breen-Lyles, M.; McCoy, K.; Flury, R.; Breeher, L.E.; Wilson, J.; Sia, I.G.; Whitaker, J.A.; Clain, J.; et al. Comparison of the QuantiFERON-TB Gold Plus and QuantiFERON-TB Gold In-Tube Interferon Gamma Release Assays in Patients at Risk for Tuberculosis and in Health Care Workers. *J. Clin. Microbiol.* **2018**, *56*. [[CrossRef](#)]
- Doberne, D.; Gaur, R.L.; Banaei, N. Preanalytical delay reduces sensitivity of QuantiFERON-TB gold in-tube assay for detection of latent tuberculosis infection. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 3061–3064. [[CrossRef](#)]
- Herrera, V.; Yeh, E.; Murphy, K.; Parsonnet, J.; Banaei, N. Immediate incubation reduces indeterminate results for QuantiFERON-TB Gold in-tube assay. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 2672–2676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Kim, E.Y.; Lim, J.E.; Jung, J.Y.; Son, J.Y.; Lee, K.J.; Yoon, Y.W.; Park, B.H.; Moon, J.W.; Park, M.S.; Kim, Y.S.; et al. Performance of the tuberculin skin test and interferon-gamma release assay for detection of tuberculosis infection in immunocompromised patients in a BCG-vaccinated population. *BMC Infect. Dis.* **2009**, *9*, 207. [CrossRef] [PubMed]
23. Page, L.; Lauruschkat, C.D.; Helm, J.; Weis, P.; Lazariotou, M.; Einsele, H.; Ullmann, A.J.; Loeffler, J.; Wurster, S. Impact of immunosuppressive and antifungal drugs on PBMC- and whole blood-based flow cytometric CD154(+) *Aspergillus fumigatus* specific T-cell quantification. *Med. Microbiol. Immunol.* **2020**, *209*, 579–592. [CrossRef] [PubMed]
24. Deborska-Materkowska, D.; Perkowska-Ptasinska, A.; Sadowska, A.; Gozdowska, J.; Ciszek, M.; Serwanska-Swietek, M.; Domagala, P.; Miszewska-Szyszkowska, D.; Sitarek, E.; Jozwik, A.; et al. Diagnostic utility of monitoring cytomegalovirus-specific immunity by QuantiFERON-cytomegalovirus assay in kidney transplant recipients. *BMC Infect. Dis.* **2018**, *18*, 179. [CrossRef]
25. El Haddad, L.; Ariza-Heredia, E.; Shah, D.P.; Jiang, Y.; Blanchard, T.; Ghantoui, S.S.; El Chaer, F.; El-Haddad, D.; Prayag, A.; Neshet, L.; et al. The Ability of a Cytomegalovirus ELISPOT Assay to Predict Outcome of Low-Level CMV Reactivation in Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *J. Infect. Dis.* **2019**, *219*, 898–907. [CrossRef] [PubMed]
26. Ma, Y.; Li, R.; Shen, J.; He, L.; Li, Y.; Zhang, N.; Wu, Q.; Zhang, J.; Zheng, J.; Wang, X. Clinical effect of T-SPOT.TB test for the diagnosis of tuberculosis. *BMC Infect. Dis.* **2019**, *19*, 993. [CrossRef] [PubMed]
27. Pourakbari, B.; Mamishi, S.; Benvari, S.; Mahmoudi, S. Comparison of the QuantiFERON-TB Gold Plus and QuantiFERON-TB Gold In-Tube interferon-gamma release assays: A systematic review and meta-analysis. *Adv. Med. Sci.* **2019**, *64*, 437–443. [CrossRef]
28. Lemieux, J.; Jobin, C.; Simard, C.; Neron, S. A global look into human T cell subsets before and after cryopreservation using multiparametric flow cytometry and two-dimensional visualization analysis. *J. Immunol. Methods* **2016**, *434*, 73–82. [CrossRef]
29. Thakur, A.; Riber, U.; Davis, W.C.; Jungersen, G. Increasing the ex vivo antigen-specific IFN-gamma production in subpopulations of T cells and NKp46+ cells by anti-CD28, anti-CD49d and recombinant IL-12 costimulation in cattle vaccinated with recombinant proteins from *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2013**, *155*, 276–283. [CrossRef]
30. Udagawa, T.; Woodside, D.G.; McIntyre, B.W. Alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29) integrin costimulation of human T cells enhances transcription factor and cytokine induction in the absence of altered sensitivity to anti-CD3 stimulation. *J. Immunol.* **1996**, *157*, 1965–1972.
31. Brakhage, A.A.; Van den Brulle, J. Use of reporter genes to identify recessive trans-acting mutations specifically involved in the regulation of *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 2781–2788. [CrossRef] [PubMed]
32. Selliah, N.; Eck, S.; Green, C.; Oldaker, T.; Stewart, J.; Vitaliti, A.; Litwin, V. Flow Cytometry Method Validation Protocols. *Curr. Protoc. Cytom.* **2019**, *87*, e53. [CrossRef]
33. Page, L.; Weis, P.; Muller, T.; Dittrich, M.; Lazariotou, M.; Dragan, M.; Waaga-Gasser, A.M.; Helm, J.; Dandekar, T.; Einsele, H.; et al. Evaluation of *Aspergillus* and *Mucorales* specific T-cells and peripheral blood mononuclear cell cytokine signatures as biomarkers of environmental mold exposure. *Int. J. Med. Microbiol.* **2018**, *308*, 1018–1026. [CrossRef] [PubMed]
34. David, J.M.; Dominguez, C.; Hamilton, D.H.; Palena, C. The IL-8/IL-8R Axis: A Double Agent in Tumor Immune Resistance. *Vaccines* **2016**, *4*, 22. [CrossRef] [PubMed]
35. Lindell, D.M.; Standiford, T.J.; Mancuso, P.; Leshen, Z.J.; Huffnagle, G.B. Macrophage inflammatory protein 1alpha/CCL3 is required for clearance of an acute *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 6364–6369. [CrossRef]
36. Meniailo, M.E.; Malashchenko, V.V.; Shmarov, V.A.; Gazatova, N.D.; Melashchenko, O.B.; Goncharov, A.G.; Seledtsova, G.V.; Seledtsov, V.I. Interleukin-8 favors pro-inflammatory activity of human monocytes/macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *56*, 217–221. [CrossRef]
37. Narni-Mancinelli, E.; Campisi, L.; Bassand, D.; Cazareth, J.; Gounon, P.; Glaichenhaus, N.; Lauvau, G. Memory CD8+ T cells mediate antibacterial immunity via CCL3 activation of TNF/ROI+ phagocytes. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 2075–2087. [CrossRef] [PubMed]
38. Yu, B.; Yang, H. Evaluation of Different Estimation Methods for Accuracy and Precision in Biological Assay Validation. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **2017**, *71*, 297–305. [CrossRef]
39. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. 2018. Available online: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf> (accessed on 8 June 2021).
40. Chaudhary, N.; Staab, J.F.; Marr, K.A. Healthy human T-Cell Responses to *Aspergillus fumigatus* antigens. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9036. [CrossRef]
41. Agarwal, R.; Chakrabarti, A.; Shah, A.; Gupta, D.; Meis, J.F.; Guleria, R.; Moss, R.; Denning, D.W.; ABPA complicating asthma ISHAM working group. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: Review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin. Exp. Allergy* **2013**, *43*, 850–873. [CrossRef]
42. Wang, F.; Zhang, C.; Jiang, Y.; Kou, C.; Kong, Q.; Long, N.; Lu, L.; Sang, H. Innate and adaptive immune response to chronic pulmonary infection of hyphae of *Aspergillus fumigatus* in a new murine model. *J. Med. Microbiol.* **2017**, *66*, 1400–1408. [CrossRef] [PubMed]
43. Zhang, Z.; Biagini Myers, J.M.; Brandt, E.B.; Ryan, P.H.; Lindsey, M.; Mintz-Cole, R.A.; Reponen, T.; Vesper, S.J.; Forde, F.; Ruff, B.; et al. β -Glucan exacerbates allergic asthma independent of fungal sensitization and promotes steroid-resistant TH2/TH17 responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *139*, 54–65.e8. [CrossRef]
44. Gour, N.; Wills-Karp, M. IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine* **2015**, *75*, 68–78. [CrossRef]

3.2.1 Supplement

Development of a simple and robust whole blood assay with dual co-stimulation to quantify the release of T-cellular signature cytokines in response to *Aspergillus* antigens.

Lauruschkat CD, Page L, White PL, Etter S, Davies HE, Duckers J, Ebel F, Schnack E, Backx M, Dragan M, Schlegel N, Kniemeyer O, Brakhage AA, Einsele H., Loeffler J #, Wurster S#.

geteilte Letztautorenschaft

Table S1: Antibodies used for flow cytometric studies.

Fluorochrome		Panels			
		Cell populations	T-cell activation	Granulocyte activation	NK-cell activation
VioBlue	Marker	CD3	CD3		
	Volume	2 µl	2 µl		
	Company	Miltenyi Biotec	Miltenyi Biotec		
FITC	Marker	CD66b	CD4	CD66b	CD3
	Volume	2 µl	2 µl	2 µl	10 µl
	Company	Miltenyi Biotec	Miltenyi Biotec	Miltenyi Biotec	BD
PE	Marker		IFN-γ	CD62L	IFN-γ
	Volume		2 µl	2 µl	2 µl
	Company		Miltenyi Biotec	Miltenyi Biotec	Miltenyi Biotec
PE-Vio615	Marker		CD69		CD69
	Volume		2 µl		2 µl
	Company		Miltenyi Biotec		Miltenyi Biotec
PerCP	Marker	CD14	CD8		CD16
	Volume	2 µl	2 µl		5 µl
	Company	Miltenyi Biotec	Miltenyi Biotec		Biologend
PE-Vio770	Marker		CD107a		CD107a
	Volume		10 µl		10 µl
	Company		Miltenyi Biotec		Miltenyi Biotec
APC	Marker	CD56	CD154	CD11b	CD56
	Volume	5 µl	2 µl	2 µl	5 µl
	Company	BD	Miltenyi Biotec	Miltenyi Biotec	BD
APC-Vio750	Marker	L/D fixable near-IR	L/D fixable near-IR	L/D fixable near-IR	L/D fixable near-IR
	Volume	0.1 µl	0.1 µl	0.1 µl	0.1 µl
	Company	Invitrogen	Invitrogen	Invitrogen	Invitrogen

Added directly to WB stimulation tubes as described in Materials & Methods (section 2.7)

Life/Dead staining (L/D) performed before extracellular staining in 1 ml Hank's balanced salt solution for 30 min

Extracellular staining

Intracellular staining

Abbreviations: APC = allophycocyanin, FITC = fluorescein isothiocyanate, IR = infra red, PE = phycoerythrin, PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein.

Table S2: Raw data for AfuLy-induced cytokine release (in pg/ml) in samples from patients with *Aspergillus*-associated lung pathologies and other chronic lung diseases.

Patient →	Control	Control	Control	Control	Control	CF	CF	ABPA	ABPA	ABPA	CPA	CPA	CPA	CPA	Median	Median	MMR
Cytokine	#1	#2	#3	#4	#5	#1	#2	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#4	Controls	Asp-ass Dis.	
IFN- γ	0.0	0.0	0.0	23.2	5.5	28.9	16.7	6.4	6.0	0.6	29.0	3.8	23.9	10.0	0.0	10.0	INF
IL-2	0.0	0.4	0.0	136.2	1.0	46.4	4.8	0.8	4.2	36.1	46.1	41.7	312.6	4.0	0.4	36.1	85.9
IL-4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	36.5	4.5	7.3	0.0	2.7	19.0	2.7	11.7	2.7	0.0	4.5	INF
IL-5	0.0	0.0	0.6	5.0	0.7	22.6	4.5	3.6	1.4	4.3	22.2	0.9	22.6	1.9	0.6	4.3	7.1
IL-10	0.0	0.0	0.0	292.6	0.0	185.5	70.4	0.0	20.3	72.8	1886.9	10.8	18.7	32.4	0.0	32.4	INF
IL-13	0.5	0.0	0.0	39.3	0.0	27.4	8.7	0.0	0.0	2.8	33.5	2.2	34.8	3.9	0.0	3.9	INF
IL-17A	0.0	0.0	1.3	48.3	6.2	28.7	21.6	8.2	10.1	5.5	24.1	4.1	17.1	14.2	1.3	14.2	10.9
TNF- α	2.1	0.0	0.0	2339.4	0.0	561.2	3324.0	0.0	1422.2	158.8	15241.4	5.4	721.4	640.6	0.0	640.6	INF
MIP-1 α	8.6	0.0	11.6	97207.3	459.9	8137.0	28744.2	45.3	3169.3	1483.2	97207.3	171.5	97191.7	1290.6	11.6	3169.3	273.0
MIP-1 β	0.0	0.0	0.0	1593.4	0.0	622.8	1026.9	0.0	412.5	415.7	23121.0	175.7	2867.8	587.1	0.0	587.1	INF
MIP-3 α	0.0	0.0	190.2	14286.5	1939.0	3459.0	12636.9	21.0	10155.0	9671.1	161434.3	256.4	3322.4	5507.9	190.2	5507.9	29.0
IL-1 β	0.0	0.0	0.0	649.7	4.6	0.0	7716.3	0.0	1527.9	85.9	53147.3	0.0	209.8	1070.2	0.0	209.8	INF
IL-6	0.0	0.0	0.0	25229.5	8.2	4647.9	2684.6	2.2	3077.8	3247.5	26841.8	7.0	11703.5	2294.6	0.0	3077.8	INF
IL-7	0.0	5.3	0.0	30.1	0.0	56.4	15.0	0.0	0.0	11.8	61.1	9.7	26.0	0.0	0.0	11.8	INF
IL-8	0.0	11402.0	52040.8	75918.0	77693.0	36622.0	96147.0	13346.0	57674.0	46756.0	89414.0	7642.5	98065.9	42691.6	52040.8	46756.0	0.9
IL-12p70	0.0	0.0	0.0	2.3	0.0	9.1	0.0	0.0	0.0	0.0	4.3	0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	ND
IL-21	0.0	0.0	0.0	126.7	0.0	129.8	89.5	0.0	17.0	58.3	179.1	0.0	128.8	38.8	0.0	58.3	INF
IL-23	0.0	0.0	36.7	146.6	0.0	527.4	180.9	0.0	0.0	37.1	253.4	0.0	169.6	104.0	0.0	104.0	INF
GM-CSF	0.0	0.0	15.3	463.4	20.2	167.0	126.6	13.6	85.7	53.5	1204.5	27.1	251.0	42.8	15.3	85.7	5.6
Fractalkine	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	356.5	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0.0	146.6	96.5	0.0	0.0	ND
ITAC	116.0	162.7	199.0	347.0	205.0	396.3	531.6	136.0	187.0	208.7	174.6	530.7	324.2	123.0	199.0	208.7	1.0

Abbreviations: ABPA = allergic bronchopulmonary aspergillosis, AfuLy = *A. fumigatus* mycelial lysate, Asp-ass. Dis. = *Aspergillus*-associated diseases, CF = cystic fibrosis, CPA = chronic pulmonary aspergillosis, INF = infinite (0 pg/ml in the control cohort), MMR = median-to-median ratio, ND = not defined (0 pg/ml in both cohorts).

Table S3: Raw data for Asp4-induced cytokine release (in pg/ml) in samples from patients with *Aspergillus*-associated lung pathologies and other chronic lung diseases.

Patient →	Control	Control	Control	Control	Control	CF	CF	ABPA	ABPA	ABPA	CPA	CPA	CPA	CPA	Median	Median	MMR
Cytokine	#1	#2	#3	#4	#5	#1	#2	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#4	Controls	Asp-ass Dis.	
IFN- γ	17.9	16.8	11.7	15.0	19.1	70.2	8.2	22.7	11.3	0.0	74.9	2.0	8.2	27.1	16.8	11.3	0.7
IL-2	7.9	5.8	1.5	0.6	8.5	17.1	8.5	9.6	12.5	3.5	11.0	0.2	4.2	6.0	5.8	8.5	1.5
IL-4	3.6	7.3	0.0	0.0	3.6	21.8	2.7	22.0	10.9	0.0	0.0	0.0	0.0	2.7	3.6	2.7	0.7
IL-5	5.5	4.8	1.2	6.3	8.6	21.8	3.1	10.3	8.8	0.1	11.3	1.2	2.4	4.6	5.5	4.6	0.8
IL-10	83.8	140.9	165.1	183.7	131.1	1244.0	871.9	127.1	631.8	125.5	16510.9	0.0	16.0	1205.6	140.9	631.8	4.5
IL-13	5.8	5.1	1.7	2.2	8.8	18.3	7.7	7.8	10.9	0.0	13.8	0.0	7.0	9.8	5.1	7.8	1.5
IL-17A	20.1	17.4	1.3	1.3	16.3	31.2	24.6	20.2	21.5	0.0	32.6	0.0	7.5	18.8	16.3	20.2	1.2
TNF- α	3821.2	1588.2	1549.4	458.8	5855.0	4319.2	1358.0	733.5	2317.2	172.1	6855.4	5.8	1349.4	3030.4	1588.2	1358.0	0.9
MIP-1 α	16981.2	917.1	4956.8	29011.3	21490.8	17247.0	23817.2	5772.5	3619.3	2302.2	97207.3	192.1	97191.7	8383.6	16981.2	8383.6	0.5
MIP-1 β	3165.2	233.1	11608.6	1901.4	4591.6	1482.8	4757.9	4294.9	1008.3	3069.1	23121.0	377.3	7902.8	4026.1	3165.2	4026.1	1.3
MIP-3 α	2732.5	0.0	2008.1	1435.5	6138.0	1963.0	11105.9	2249.3	5514.0	4790.1	51071.3	448.4	1423.4	4409.9	2008.1	4409.9	2.2
IL-1 β	2346.7	544.3	873.1	2833.3	4274.9	3334.8	805.8	1786.8	1531.9	189.3	30955.3	6.0	2881.3	3316.2	2346.7	1786.8	0.8
IL-6	7674.8	1403.3	4808.5	23183.5	8457.1	11960.9	4989.6	5462.0	14414.8	2043.5	26208.8	88.3	15881.5	12362.6	7674.8	11960.9	1.6
IL-7	12.7	3.9	1.4	NA	57.1	28.0	0.0	0.0	62.1	11.4	57.3	0.0	36.3	0.0	8.3	11.4	1.4
IL-8	22731.0	624.0	7935.8	24880.0	57937.0	28772.0	48113.0	17375.0	44006.0	8148.0	101520.0	289.5	74112.9	19525.6	22731.0	28772.0	1.3
IL-12p70	14.0	2.2	0.0	5.5	16.2	25.0	0.0	5.5	7.2	0.0	6.7	0.0	2.3	8.5	5.5	5.5	1.0
IL-21	34.2	44.0	35.9	81.0	65.5	97.1	49.5	0.0	136.5	19.6	172.8	0.0	133.6	66.2	44.0	66.2	1.5
IL-23	141.6	351.2	109.5	468.4	883.0	789.4	127.0	353.7	300.1	37.1	360.4	0.0	527.7	157.0	351.2	300.1	0.9
GM-CSF	79.9	85.4	53.5	168.5	137.8	311.1	87.6	159.4	184.0	33.4	759.2	0.0	204.6	97.6	85.4	159.4	1.9
Fractalkine	0.0	167.5	0.0	0.0	174.2	253.6	0.0	0.0	155.4	0.0	0.0	0.0	0.0	112.3	0.0	0.0	ND
ITAC	254.0	24.6	6.0	147.0	327.0	306.8	186.6	155.7	188.0	9.5	101.6	155.7	20.6	10.9	147.0	155.7	1.1

Abbreviations: ABPA = allergic bronchopulmonary aspergillosis, AfuLy = *A. fumigatus* mycelial lysate, Asp-ass. Dis. = *Aspergillus*-associated diseases, CF = cystic fibrosis, CPA = chronic pulmonary aspergillosis, INF = infinite (0 pg/ml in the control cohort), MMR = median-to-median ratio, NA = not available (invalid measurement), ND = not defined (0 pg/ml in both cohorts).

3.3 Kapitel 3: Chronic occupational mold exposure drives expansion of *Aspergillus*-reactive type 1 and type 2 T-helper cell responses.

Autorenliste:

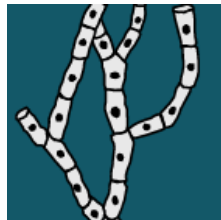
Lauruschkat CD, Etter S, Schnack E, Ebel F, Schäuble S, Page L, Rümens D, Dragan M, Schlegel N, Panagiotou G, Kniemeyer O, Brakhage AA, Einsele H., Wurster S[#], Loeffler J[#].

(Die experimentellen ELISPOT-Daten von Abbildung 4, 5 sowie die ELISPOT-Daten, die einen Teil von Abbildung 6 ausmachen, und die serologischen Daten, die im Artikel mit *data not shown* gezeigt wurden, wurden von Frau Sonja Etter generiert und werden als Teil Ihrer Dissertation in veränderter Form eingereicht.)

[#] geteilte Letztautorenschaft

Journal:

J Fungi (Basel). (EISSN 2309-608X)



Journal of
Fungi

Ausgabe:

2021 Aug 27;7(9):698 (b)

Doi:






<https://doi.org/10.3390/jof7060462>.

Sekundäre Veröffentlichung:

Die sekundäre Veröffentlichung findet mit der schriftlichen Genehmigung des Journals unter der CC BY-Lizenz (*Open Access*) statt.

Article

Chronic Occupational Mold Exposure Drives Expansion of *Aspergillus*-Reactive Type 1 and Type 2 T-Helper Cell Responses

Chris D. Lauruschkat ¹, Sonja Etter ¹, Elisabeth Schnack ², Frank Ebel ² , Sascha Schäuble ³, Lukas Page ¹, Dana Rümens ¹, Mariola Dragan ⁴, Nicolas Schlegel ⁴ , Gianni Panagiotou ^{3,5}, Olaf Kniemeyer ⁶, Axel A. Brakhage ⁶ , Hermann Einsele ¹ , Sebastian Wurster ^{7,†}  and Juergen Loeffler ^{1,*,†}

- ¹ Department of Internal Medicine II, University Hospital of Wuerzburg, 97080 Wuerzburg, Germany; Lauruschka_c@ukw.de (C.D.L.); sonja.etter@stud-mail.uni-wuerzburg.de (S.E.); E_Page_L@ukw.de (L.P.); dana_alicia.ruemens@stud-mail.uni-wuerzburg.de (D.R.); Einsele_H@ukw.de (H.E.)
- ² Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig-Maximilians-University of Munich, 80539 Munich, Germany; Elisabeth.Schnack@micro.vetmed.uni-muenchen.de (E.S.); frank.ebel@lmu.de (F.E.)
- ³ Systems Biology and Bioinformatics, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology—Hans-Knoell-Institute (HKI), 07745 Jena, Germany; sascha.schauble@hki-jena.de (S.S.); gianni.panagiotou@hki-jena.de (G.P.)
- ⁴ Department of Surgery I, University Hospital of Wuerzburg, 97080 Wuerzburg, Germany; Dragan_M@ukw.de (M.D.); schlegel_n@ukw.de (N.S.)
- ⁵ Department of Microbiology, Li Ka Shing Faculty of Medicine, The University of Hong Kong, Hong Kong, China
- ⁶ Department of Molecular and Applied Microbiology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology—Hans-Knoell-Institute (HKI), 07745 Jena, Germany; Olaf.Kniemeyer@hki-jena.de (O.K.); axel.brakhage@leibniz-hki.de (A.A.B.)
- ⁷ Department of Infectious Diseases, Infection Control and Employee Health, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, USA; STWurster@mdanderson.org
- * Correspondence: Loeffler_J@ukw.de; Tel.: +49-931-201-36412
- † Contributed equally.



Citation: Lauruschkat, C.D.; Etter, S.; Schnack, E.; Ebel, F.; Schäuble, S.; Page, L.; Rümens, D.; Dragan, M.; Schlegel, N.; Panagiotou, G.; et al. Chronic Occupational Mold Exposure Drives Expansion of *Aspergillus*-Reactive Type 1 and Type 2 T-Helper Cell Responses. *J. Fungi* **2021**, *7*, 698. <https://doi.org/10.3390/jof7090698>

Academic Editor: Florence Persat

Received: 15 July 2021

Accepted: 25 August 2021

Published: 27 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Occupational mold exposure can lead to *Aspergillus*-associated allergic diseases including asthma and hypersensitivity pneumonitis. Elevated IL-17 levels or disbalanced T-helper (Th) cell expansion were previously linked to *Aspergillus*-associated allergic diseases, whereas alterations to the Th cell repertoire in healthy occupationally exposed subjects are scarcely studied. Therefore, we employed functional immunoassays to compare Th cell responses to *A. fumigatus* antigens in organic farmers, a cohort frequently exposed to environmental molds, and non-occupationally exposed controls. Organic farmers harbored significantly higher *A. fumigatus*-specific Th-cell frequencies than controls, with comparable expansion of Th1- and Th2-cell frequencies but only slightly elevated Th17-cell frequencies. Accordingly, *Aspergillus* antigen-induced Th1 and Th2 cytokine levels were strongly elevated, whereas induction of IL-17A was minimal. Additionally, increased levels of some innate immune cell-derived cytokines were found in samples from organic farmers. Antigen-induced cytokine release combined with *Aspergillus*-specific Th-cell frequencies resulted in high classification accuracy between organic farmers and controls. AspF22, CatB, and CipC elicited the strongest differences in Th1 and Th2 responses between the two cohorts, suggesting these antigens as potential candidates for future bio-effect monitoring approaches. Overall, we found that occupationally exposed agricultural workers display a largely balanced co-expansion of Th1 and Th2 immunity with only minor changes in Th17 responses.

Keywords: mold exposure; immunoassay; biomarker; *Aspergillus*; cytokines; inflammation; adaptive immunity; hypersensitivity

1. Introduction

Humans inhale hundreds of airborne spores of environmental molds daily such as *Aspergillus* species [1]. While healthy individuals can efficiently clear fungal spores

from their lungs, chronic mold exposure is a major risk factor for the development of hypersensitivity. Dysregulation of the immune system due to long-term exposure to high concentrations of *Aspergillus* spores can lead to severe asthma with fungal sensitization, allergic sinusitis, allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), and hypersensitivity pneumonitis [2–4]. Of note, a significant proportion of *Aspergillus*-associated allergic diseases are seen in occupationally exposed patients such as agricultural workers [2,5–8]. However, in contrast to serological responses, little is known about the effects of intensive and chronic occupational mold exposure on the human *Aspergillus*-reactive T-(helper) cell repertoire.

Recent advances in functional immunoassays have improved our understanding of mold-antigen reactive T-cell subsets in diverse patient populations with *Aspergillus*-associated diseases and individuals with varying degrees of mold exposure. Specifically, we and others have previously shown that environmental exposure to molds and mycotoxins can result in assayable alterations to the human mold-reactive T-cell repertoire and proinflammatory cytokine release [9–11]. However, these studies have been performed in predominantly residentially exposed subjects who had a relatively low risk of *Aspergillus*-associated diseases, whereas data regarding the specific impact of occupational mold exposure on *Aspergillus fumigatus*-antigen reactive T-cell expansion, polarization, and cytokine responses are scarce.

Therefore, we employed flow cytometry, enzyme-linked immunospot assays (ELISPOT), and a recently developed whole-blood-based cytokine release assay [12] with dual T-cellular co-stimulation in order to compare T-helper (Th) cell responses to mold antigens in a defined occupationally mold-exposed cohort and non-occupationally exposed controls. We selected agricultural workers as our occupationally exposed cohort due to their known risk for extensive *Aspergillus* exposure, mold sensitization, and development of asthma and hypersensitivity pneumonitis (“farmer’s lung”) [5,6,13]. In particular, organic farming approaches that, among other restrictions, omit the use of azoles and other chemical fungicides, can result in higher abundance of *A. fumigatus* compared to conventional production [14].

Although methodologies for recombinant expression of *Aspergillus* proteins have been considerably improved and some antigens are commercially available, systematic studies of exposure-dependent T-cell responses to individual *A. fumigatus* antigens have not been performed thus far [15]. Hence, the most potent *A. fumigatus* antigens for the development of bio-effect monitoring strategies by means of functional T-cell assays remain to be defined. To that end, we analyzed *A. fumigatus* antigen-reactive type-1 (Th1), type-2 (Th2), and type-17 (Th17) Th cell responses to a mycelial lysate and 12 proteinaceous *A. fumigatus* antigens in samples from organic farmers and controls and describe discriminative Th cell frequencies as well as *A. fumigatus* driven Th1, Th2, and Th17 associated cytokine releases.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

The occupationally exposed cohort included 9 male and 1 female organic farmer(s) aged 18–70 (median: 30) who have worked in the agricultural industry for 1 to 30 years (median: 9) and were sampled within three months after the harvesting period. Organic farming approaches were verified by the following certifications documenting consistency of agricultural practices with the European Council regulation on organic production and labelling of organic products (834/2007): Demeter (DE-ÖKO-022), Naturland, A-B-CERT (DE-ÖKO-06), and/or Kontrollverein ökologischer Anbau e.V. (DE-ÖKO-022). The control cohort consisted of 4 male and 6 female healthy blood donors aged 22–65 (median: 25). Exclusion criteria for both cohorts were pregnancy, acute infections or recent antimicrobial therapy (within the last 12 weeks), and allergic diseases requiring immunomodulatory treatment (within the last 12 weeks).

2.2. Blood Collection and PBMC Isolation

Venous blood was drawn into Monovette® lithium heparin blood collection tubes (Sarstedt, Newton, USA). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using Leucosep™ tubes (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) and Biocoll® separation solution (1.077 g/mL, Merck, Darmstadt, Germany). After separation, PBMCs were washed with 45 mL of CTL Wash™ (CTL Europe, Bonn, Germany) and suspended in 1 mL of CTL Wash™. Cells were counted with a Vi-Cell XR counter (Beckman Coulter, Brea, USA) and divided for ELISPOT and flow cytometry. After centrifugation, PBMCs for flow cytometry were resuspended at a concentration of 1×10^7 cells per mL in RPMI 1640 Glutamax™ (Gibco, Thermo Fisher, Waltham, USA) supplemented with 5% heat-inactivated, sterile-filtered autologous serum. PBMCs for ELISPOT were diluted in CTL Test™ medium (CTL Europe, Bonn, Germany) at a concentration of 2×10^6 cells per mL.

2.3. Aspergillus Fumigatus Mycelial Lysate and Recombinant Antigen Generation

An *A. fumigatus* mycelial lysate (AfuLy) and proteinaceous antigens were generated as described before [12]. Primer sequences for the amplification of fungal cDNA are provided in Table S1.

2.4. ELISPOT

IFN- γ , IL-5, and IL-17 ELISPOT assays (Lophius Biosciences, Regensburg, Germany) were performed according to the manufacturer's recommendations, with minor modifications as described before [16]. Briefly, 2×10^5 PBMCs were added to each well of the ELISPOT plate and stimulated with AfuLy (50 μ g/mL) or proteinaceous antigens (30 μ g/mL). Plates for IFN- γ or IL-5 ELISPOTs were supplemented with 1 μ g/mL α -CD28 and 1 μ g/mL α -CD49d co-stimulatory antibodies (both Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), whereas no co-stimulatory antibodies were used for IL-17 ELISPOTs, following previously optimized protocols [17]. Phytohemagglutinin (PHA, 10 μ g/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) served as a positive control. Unstimulated control wells contained PBMCs and co-stimulatory factors (if applicable), but no antigens. IFN- γ ELISPOTs were incubated for 24–26 h at 37 °C and 5 % CO₂, whereas longer incubation (44–48 h) was used for IL-5 and IL-17 ELISPOTs. Staining was performed according to the manufacturer's instructions and numbers of spot-forming cells (SFCs) per million PBMCs were determined with a Bioreader 5000a (BioSYS, Karben, Germany), using previously published readout settings [17].

2.5. Flow Cytometry

Flow cytometry was performed as described before [18]. α -CD8-FITC, α -CD196 (CCR6)-APC, α -CD197 (CCR7)-PE, α -CD4-VioBlue, α -CD183 (CXCR3)-PE-Vio615, α -CD45RA-VioGreen, α -CD154-PE-Vio770, α -IFN- γ -APC-Vio770, and 7-aminoactinomycin D staining solution (all Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) were used for cell staining in combination with the Inside Stain Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). All dyes were stained extracellularly, except for the intracellular markers CD154 and IFN- γ . Samples were measured using a CytoFLEX cytometer and CytExpert software (Beckman-Coulter, Brea, USA). Data were analyzed with FlowJo 10.6.1. The gating strategy and a representative dataset are shown in Figure S1.

2.6. Whole-Blood Stimulation for Multiplex Cytokine Assays

Anticoagulant-free stimulation tubes were prepared as detailed in Table S2, following a previously published protocol [12], and cryopreserved at -20 °C for up to four weeks. Prior to whole-blood (WB) stimulation, the ready-to-use stimulation tubes were brought to room temperature. Within 90 min of blood collection, 500 μ L of WB was injected into the tubes with a graduated 1-mL insulin syringe. Stimulation tubes were inverted 10 times and incubated for 24 h at 37 °C. Plasma was collected by centrifugation at $2000 \times g$ for 20 min and cryopreserved at -20 °C. Cytokine concentrations were determined using a

21-plex Milliplex® MAP human high-sensitivity T-cell magnetic bead panel kit (Merck, Darmstadt, Germany) and a Luminex200 reader (Luminex, Austin, TX, USA) in combination with the XPONENT3 (Luminex, Austin, TX, USA) and Milliplex Analyte software (Merck, Darmstadt, Germany). Cytokine concentrations were interpolated from 7-point standard curves.

2.7. Statistical Analyses

All immunoassay results presented in this manuscript were adjusted for unspecific background reactivity by subtraction of activation marker expression or cytokine release detectable in unstimulated samples. The Mann–Whitney-U-test with or without subsequent Benjamini–Hochberg correction for a false-positive discovery rate (FDR) of 0.2 was applied for significance testing (as specified in the figure legends). The correlation of results across different assays was evaluated by Spearman’s rank correlation coefficients. The classification of organic farmers and controls based on immunoassay results was accomplished by optimizing a random forest machine learning model using the caret (v6.0) package in the R statistical programming environment (v4.1). Combinations of up to three cytokine analytes were tested with and without consideration of *A. fumigatus*-specific T-cell frequencies. Caret’s train and trainControl functions were applied for random forest optimization using 5-fold cross-validation that was repeated 100 times based on center-scaled input data. Overall accuracy across all repeated cross-validation runs was reported as model performance. Data were analyzed and visualized using GraphPad Prism version 8 and Microsoft Excel.

3. Results

At first, we performed flow cytometry to determine the total *A. fumigatus* reactive Th cell repertoire of organic farmers and subjects without occupational mold exposure. The organic farmer cohort had significantly greater median CD154⁺ AfuLy-specific Th cell frequencies (0.116%) than the control cohort (0.085%, $p = 0.020$, Figure 1a). Consistent with our previously published results [9,10], all three control subjects with more than 0.1% *A. fumigatus*-specific Th cells had significant residential mold exposure (“high exposure”), as determined using a previously validated questionnaire to capture surrogates of mold encounter such as close proximity of the place of residence to farmlands [10] (Figure S2). In contrast, five out of seven control subjects with *A. fumigatus*-specific T-cell frequencies of <0.1% had a “low exposure” profile as defined in reference [10].

When assessing effector and memory phenotypes of *A. fumigatus*-specific Th cells by CCR7 and CD45RA expression, no significant differences in relative distributions of phenotypes were found between organic farmers and controls (Figure 1b). Instead, all subsets except effector Th cells were moderately yet non-significantly expanded in the organic farmer cohort (Figure 1c). Similarly, no significant elevations of individual Th cell lineages were found in the organic farmer cohort (Figure 1b,d). However, both median Th1 (+47%) and Th2 (+38%) cell frequencies were modestly expanded in organic farmers, whereas median AfuLy-reactive Th17 cell frequencies differed by only 7% between the two cohorts (Figure 1d).

Next, we employed a WB-based cytokine assays to quantify the release of 21 cytokines and chemokines in response to AfuLy and the well-characterized *A. fumigatus* allergens Asp4 and Asp19/Crf1 [19–24]. Although not reaching statistical significance after correction for multiple testing, all three stimuli elicited 3.3–7.6-fold greater median IFN- γ release in samples from organic farmers compared to controls (Figures 2a and S3a–c). Similarly, elevations of the Th2 cytokines IL-4, IL-5,2 and, in particular, IL-13 were found in the organic farmer cohort (Figures 2b,d and S3a–c). In contrast, differences in IL-17 response between the two cohorts were relatively minor (median-median-ratio ≤ 1.9 , Figures 2e and S3a–c). Compared to controls, organic farmers also showed 10-fold greater median release of the regulatory T-cell (Treg) signature cytokine IL-10 in AfuLy-stimulated WB (Figures 2f and S3a). Furthermore, strongly enhanced release (≥ 10 -fold median-to-

median ratio) of several cytokines predominantly derived from antigen-presenting cells (APCs), especially GM-CSF, MIP-1 α , IL-6, and IL-21, was found in AfuLy-stimulated WB from organic farmers versus controls (Figures 2g–j and S3a). Although less pronounced, similar trends were found for Asp4 and Crf1 stimulation (Figure S3b,c). Collectively, these data indicate that occupational mold exposure triggers enhanced Th1 and Th2 cytokine release as well as increased APC activation in response to *A. fumigatus* antigens.

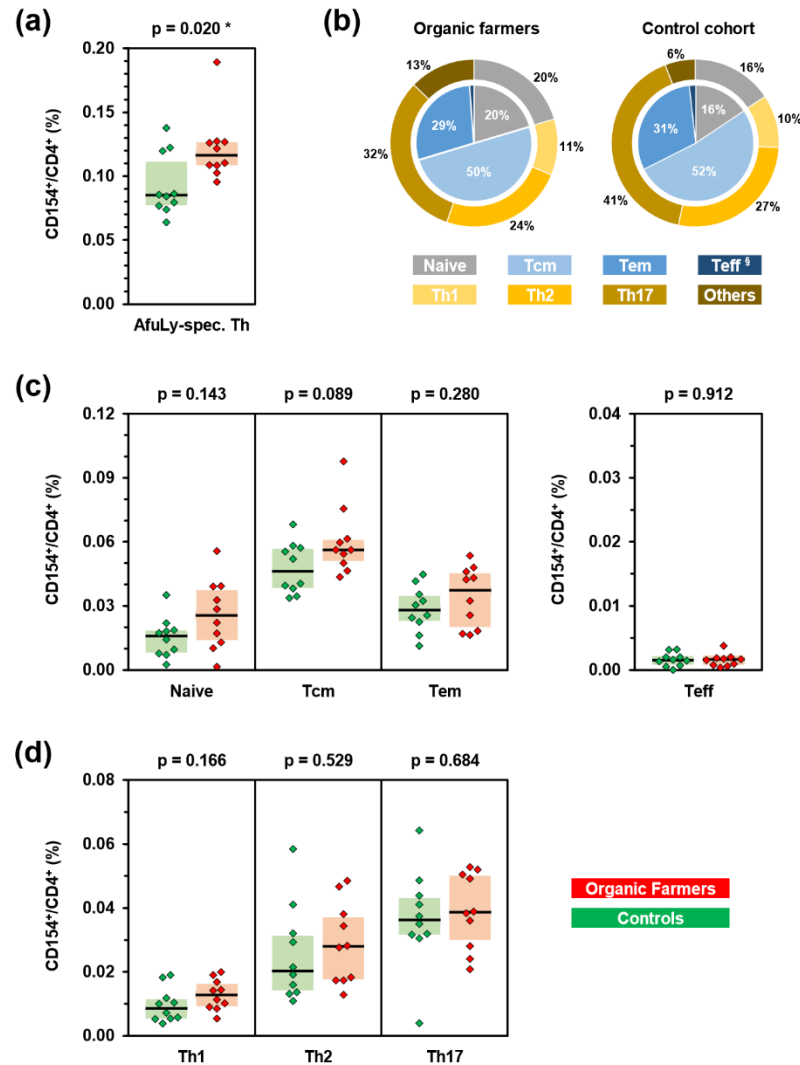


Figure 1. Subjects with occupational mold exposure harbor increased frequencies of *A. fumigatus*-specific T-helper (Th) cells. PBMCs from 10 organic farmers (red) and 10 non-occupationally exposed control subjects (green) were stimulated with *A. fumigatus* mycelial lysate (AfuLy). Frequencies and phenotypes of CD154⁺ Th cells (CD4⁺ cells) were determined by flow cytometry. (a) Total background-adjusted AfuLy-specific Th cell frequencies. (b) Mean percentages of effector/memory phenotypes (inner pie) and Th cell lineages (outer ring) among CD4⁺CD154⁺ AfuLy-specific Th cells in organic farmers and controls. Tcm = central memory Th cells, Tem = effector memory Th cells, Teff = effector Th cells (§ 1% in organic farmers, 2% in controls). (c,d) Frequencies of AfuLy-reactive CD154⁺ effector/memory Th cell populations (c) and Th1/Th2/Th17 cells (d) among CD4⁺ Th cells in organic farmers and controls. (a,c,d) Background-adjusted individual values, medians (black bars), and inter-quartile ranges (colored boxes) are shown. Two-sided Mann–Whitney–U-test. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$).

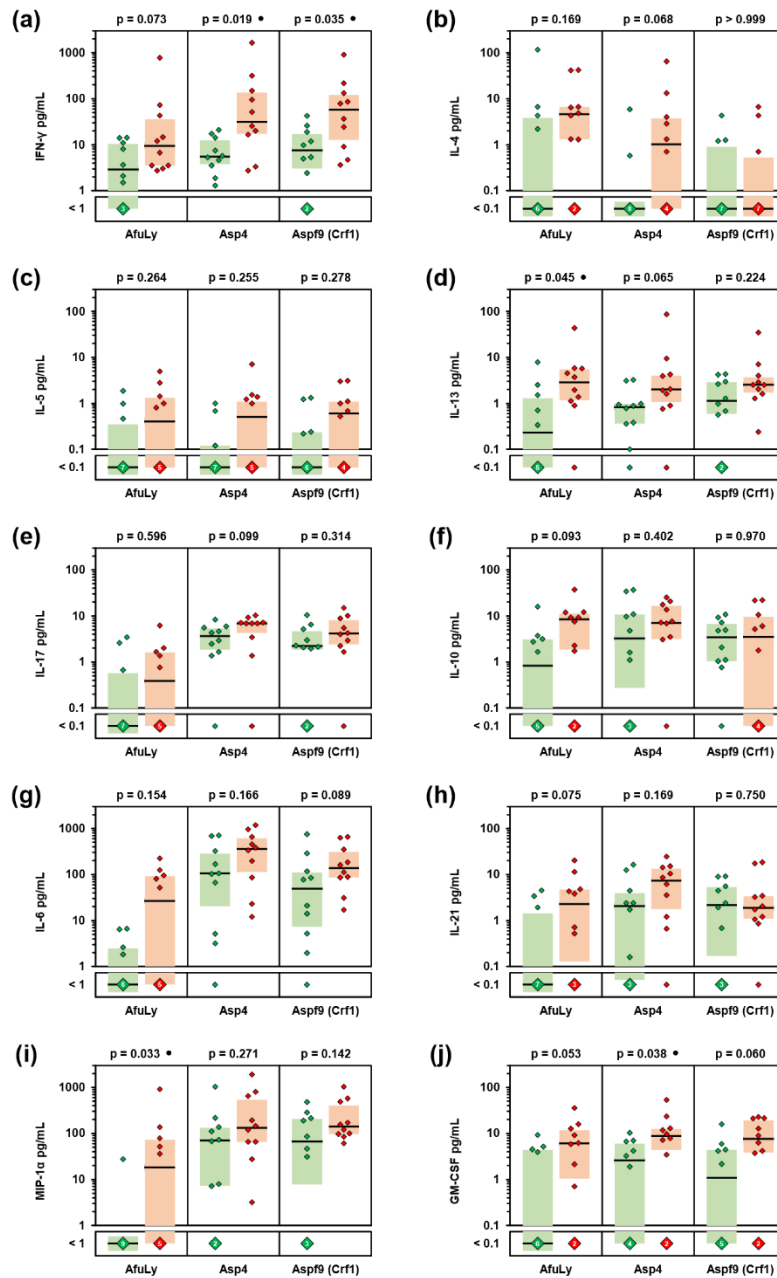


Figure 2. Organic farmers show enhanced Th1, Th2, and innate immune cell-derived cytokine responses to *A. fumigatus* antigens. Whole-blood samples from 10 organic farmers (red) and 10 non-occupationally exposed controls (green) were stimulated with *A. fumigatus* mycelial lysate (AfuLy), Asp4, or Asp9/Crf1. Cytokine concentrations in plasma supernatants were quantified using a Luminex assay. Individual and median (black bars) background-adjusted cytokine concentrations of INF- γ (a), IL-4 (b), IL-5 (c), IL-13 (d), IL-17 (e), IL-10 (f), IL-6 (g), IL-21 (h), MIP-1 α (i), and GM-CSF (j) are shown. Colored boxes represent inter-quartile ranges. Two-sided Mann–Whitney–U-test with Benjamini–Hochberg correction for an FDR of 0.2. No comparison reached FDR-corrected significance between organic farmers and controls ($p < 0.05$, FDR < 0.2). Black circles indicate a trend toward significance ($p < 0.05$, FDR > 0.2).

Considering both median-to-median ratios between the two cohorts and statistical significance, we identified a selection of eight cytokines that displayed the strongest

differences in *A. fumigatus* antigen-induced release between the two cohorts (Figure S4). Cytokines with markedly stronger induction by AfuLy in organic farmers than in controls included the Th1 cytokine INF- γ , the Th2 cytokines IL-4 and IL-13, the Treg cytokine IL-10, and the innate immune cell-derived cytokines IL-6, IL-21, MIP-1 α , and GM-CSF (Figure S4). Seven out of the eight cytokines were also identified as differently induced by Asp4 and/or Asp9/Crf1 (Figure S4). Based on this pre-selection, we found strong and significant positive correlation of individual AfuLy-reactive T-cellular cytokine responses, but also strong positive correlation between T-cellular and APC cytokine release (Figure 3a; all assayed cytokines are shown in Figure S5). These results indicate co-induction of antigen-reactive Th1 and Th2 responses in the organic farmer cohort and point to a role of highly correlated innate immune cell-derived cytokines in shaping *A. fumigatus*-reactive immune responses in subjects with extensive occupational mold exposure.

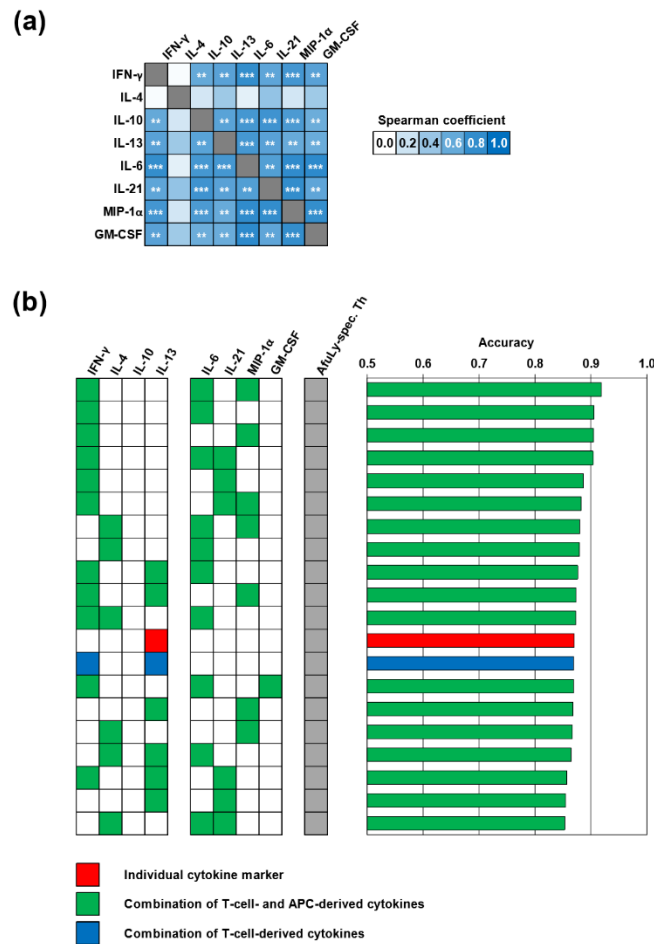


Figure 3. Machine learning corroborates a selection of highly correlated T-cellular and APC-derived cytokine responses with robust discriminatory power between occupationally exposed subjects and controls. **(a)** Heatmap of Spearman’s rank correlation coefficients of individual cytokine concentrations elicited by *A. fumigatus* mycelial lysate (AfuLy, Luminex assay results). FDR-corrected significance of Spearman coefficients is indicated by asterisks. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **(b)** Random forest analysis to determine the classification accuracy of combinations of up to three cytokine responses to AfuLy along with flow cytometrically determined CD154⁺ AfuLy-reactive T-helper cell frequencies. The top 20 combinations with the highest classification accuracy organic farmers and controls are shown. Only cytokine markers passing the pre-filtering step (Figure S4) based on their relative induction in the two cohorts (median-to-median ratio > 2.0) and p -value ($p < 0.2$) were considered for both panels.

We then employed a machine learning algorithm using random forest classification to further narrow down the cytokines with the best discriminatory power between organic farmers and controls. Four combinations of AfuLy-elicited cytokines with modest discriminatory power (>0.75) were found, all of them containing the Th1 cytokine INF- γ along with cytokines derived from innate immune cells, with or without the Th2 cytokine IL-4 (Figure S6). In line with our previously published results [9], classification accuracy between samples from organic farmers and controls strongly improved when combining AfuLy-reactive Th cell frequencies and up to three cytokine markers (Figure 3b). Despite the heterogeneity of the control cohort, the combination of AfuLy-reactive Th cell frequencies with IFN- γ , IL-6, and MIP-1 α release resulted in a classification accuracy of 92%, suggesting potential usefulness of these cytokine markers for bio-effect monitoring strategies in occupationally exposed subjects. Of note, all the top 11 most accurate combinations (classification accuracy 87–92%) contained a Th1 (IFN- γ) and/or Th2 cytokine (IL-4) in combination with at least one of the APC-derived cytokines IL-6, IL-21, and MIP-1 α (Figure 3b).

Next, we sought to characterize exposure-driven differences in immune responses to individual *A. fumigatus* antigens. To that end, we used ELISPOT assays to compare the frequencies of cells secreting Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-5), and Th17 (IL-17) signature cytokines after stimulation with AfuLy and 12 proteinaceous *A. fumigatus* antigens (Figure 4). Although not reaching statistical significance due to the limited number of subjects, eight antigens (Aspf3, Aspf4, Aspf8, Aspf9, Aspf22, CatB, CipC, and Hly) elicited at least 2-fold higher IFN- γ SFC counts in PBMCs from organic farmers compared with controls (Figure 4a). Similarly, eight antigens (Aspf1, Aspf6, Aspf8, Aspf22, CatB, CipC, Hly, and Pst2) caused >2 -fold greater IL-5 responses of PBMCs from organic farmers versus controls (Figure 4b).

A volcano plot analysis combining the relative median SFC counts in the two cohorts with non-parametric significance testing revealed that Aspf22, CipC, and CatB elicited the most strongly distinct Th1 and Th2 responses between the two cohorts (Figure 5). Consistent with the results of our multiplex cytokine assays, ELISPOT showed minimal differences in IL-17 responses between the two cohorts, with only two antigens (Aspf1/Crf9 and CnsB) eliciting ≥ 2 -fold greater median SFC counts in samples from organic farmers than in control samples (Figures 4c and 5). Altogether, these data further corroborate the co-induction of Th1 and Th2 but not Th17 signature cytokine responses to selected *A. fumigatus* antigens in healthy, occupationally mold-exposed individuals.

Lastly, we tested whether our findings represent global co-induction of Th1 and Th2 responses in organic farmers or whether agricultural workers with longer durations of service/employment, and thus, more chronic exposure, display a distinct phenotype. Interestingly, across all three assay platforms, we consistently observed weak to moderate negative correlation between the number of years worked in organic farming and the Th1/Th2 balance (Figure 6a), suggesting stronger Th2 expansion in longer-serving farmers. Given the small cohort size, this observation only reached statistical significance for cytokine responses to Aspf8 and CatB in ELISPOT analyses (Figure 6b). Nonetheless, these data indicate some nuances to Th1/Th2 co-induction in our organic farmer cohort, with a trend toward stronger Th2 polarization in subjects with more chronic occupational mold exposure.

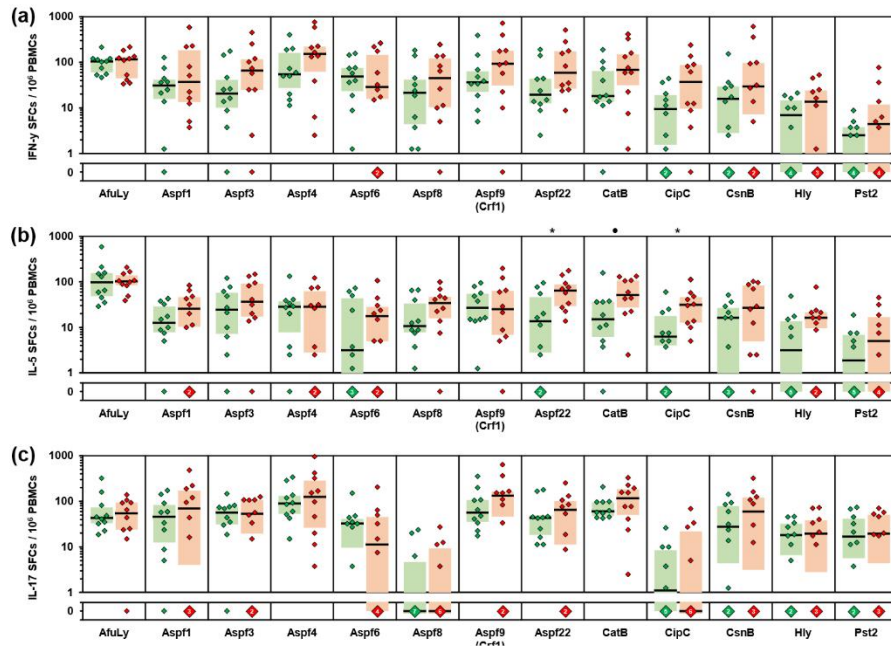


Figure 4. PBMCs from organic farmers display enhanced Th1 and Th2 responses to selected *A. fumigatus* antigens compared with non-occupationally exposed controls. PBMCs from 10 organic farmers (red) and 10 non-occupationally exposed control subjects (green) were stimulated with *A. fumigatus* mycelial lysate (AfuLy) or proteins. Numbers of IFN- γ (a), IL-5 (b), and IL-17 (c) producing cells (spot forming cells, SFCs) per million PBMCs were determined by ELISPOT. Individual background-adjusted SFC counts, medians (black bars), and inter-quartile ranges (colored boxes) are shown. Two-sided Mann–Whitney–U-test with Benjamini–Hochberg correction for an FDR of 0.2. Asterisks indicate significant differences between organic farmers and controls ($p < 0.05$, FDR < 0.2). Black circles indicate a trend toward significance ($p < 0.05$, FDR > 0.2).

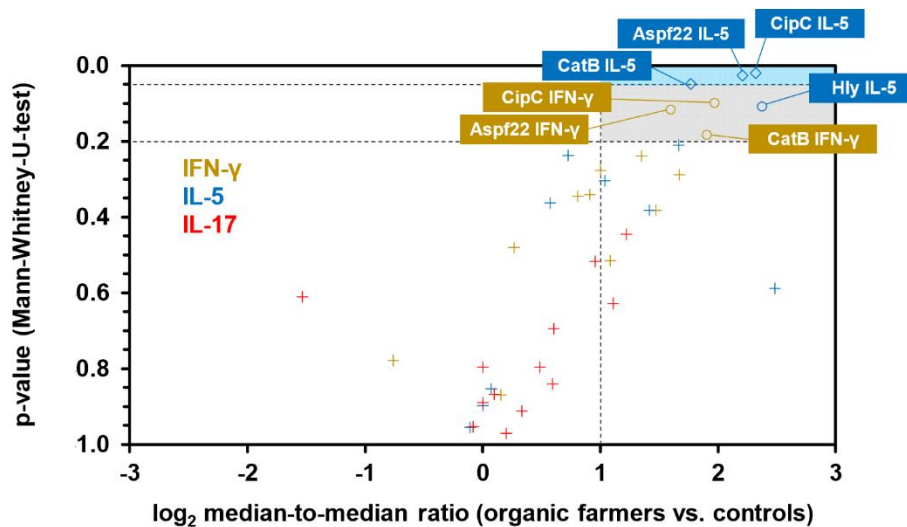


Figure 5. ELISPOT reveals a cluster of proteinaceous *A. fumigatus* antigens that elicit enhanced Th1 and Th2 signature cytokine response in subjects with occupational mold exposure. Volcano plot combining \log_2 -transformed ratios of median SFCs counts for each antigen/cytokine pair in organic farmers and controls with the corresponding p -values (Mann–Whitney–U-test). Raw data are derived from Figure 4. Antigen/cytokine pairs are classified as insignificant (“+” symbols, median-to-median ratio < 2 and/or $p > 0.2$), potentially significant (circles, median-to-median ratio > 2 and $0.05 < p < 0.2$), or significant (diamonds, median-to-median ratio > 2 and $p < 0.05$). Antigen/cytokine pairs with medians of 0 SFCs in both cohorts are not displayed.

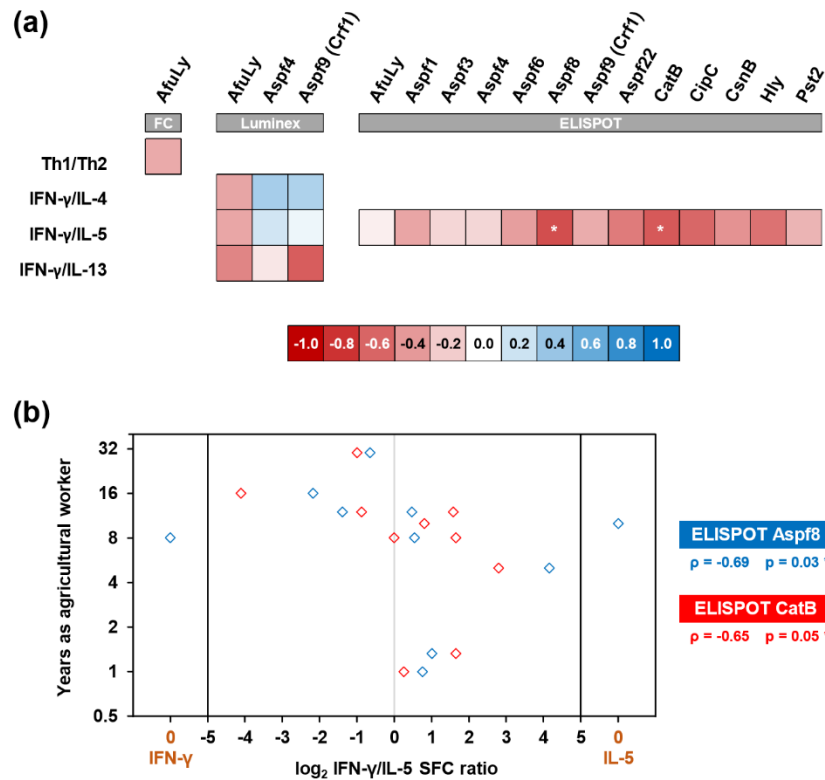


Figure 6. Chronic occupational mold exposure moderately correlates with a Th2-polarized immune phenotype. (a) Heatmap of Spearman's rank correlation coefficients between the duration of service in organic farming and individual Th1/Th2 ratios (flow cytometry, FC) or ratios of Th1 (IFN- γ) and Th2 (IL-4, IL5, and IL-13) signature cytokine release detectable by WB-based Luminex analysis and ELISPOT after stimulation with *A. fumigatus* antigens. * $p < 0.05$. (b) Individual log₂-transformed ratios of IFN- γ and IL-5 spot forming cell counts (SFC) upon stimulation with Asp8 and CatB (x-value) compared with the subjects' duration of service in organic farming (y-value). Spearman's rank correlation coefficients (ρ) and their two-sided p -values are given.

4. Discussion

Occupational mold exposure is associated with the development of asthma and hypersensitivity pneumonitis and can worsen symptoms of a wide range of allergic diseases [2,5–8]. Given its small, respirable conidial size and ubiquitous presence in the environment, *A. fumigatus* is responsible for a significant portion of mold-associated allergic diseases [2–4]. In previous studies, we have shown that *A. fumigatus* exposure contributes to elevated frequencies of *A. fumigatus* specific T cells detectable by flow cytometry or cytokine assays [9,10]. However, in these studies, we examined a heterogeneous group of donors with residential and occupational exposures, who mostly had no risk for *Aspergillus*-associated hypersensitivity diseases. In order to better understand the effects of chronic occupational mold exposure, we herein studied *A. fumigatus*-reactive Th cell responses of organic farmers, a cohort at risk for *Aspergillus*-associated hypersensitivity diseases [5,6,13], and compared the results to those of non-occupationally exposed subjects.

Expectedly, organic farmers had significantly higher CD154⁺ AfuLy-specific Th-cell frequencies than non-occupationally exposed individuals. However, specific Th-cell frequencies of occupationally exposed organic farmers overlapped with those of subjects reporting residential exposure. Thus, chronic occupational mold exposure does not necessarily lead to strongly elevated specific Th-cell frequencies, hinting at regulatory mechanisms that prevent an excessive immune response to high spore exposure and, eventually, hypersensitivity diseases. In fact, Treg cells were shown to play an important role in

the modulation of adaptive immunity to *A. fumigatus* [25]. Although not the focus of this study, we found that AfuLy-stimulated WB samples from organic farmers produced 10-fold greater levels of the Treg signature cytokine IL-10 than those from controls, while IL-10 release was strongly correlated with elevated Th1 and Th2 responses.

Consistent with animal studies showing that extensive or serial exposure of healthy mice or piglets to *A. fumigatus* conidia led to a co-expansion of various Th cell subsets [26,27], our cohort of organic farmers without known mold-associated hyperinflammatory diseases displayed a comparable increase in AfuLy-reactive Th1 and Th2 cells. Accordingly, ELISPOT and WB-based Luminex assays revealed marked induction of *A. fumigatus* antigen-reactive Th1- and Th2-cell-derived cytokines in organic farmers, whereas differences in IL-17 levels were much smaller between the two cohorts. In contrast to these findings in our healthy mold-exposed cohort of agricultural workers, we and others previously reported that patients with *Aspergillus*-associated hypersensitivity diseases, such as ABPA, display strongly elevated Th17 cytokine responses to *A. fumigatus* antigens [12,28]. Although important in the initial stage of fungal clearance [29–32], enhanced Th17-cell activation has been associated with *Aspergillus* airway colonization and fungal persistence and is considered a driving factor in the establishment of hypersensitivity pneumonitis, a potential complication of chronic occupational mold exposure [28,33–37].

Our results further indicate that increased Th2 cytokine levels in response to *Aspergillus* antigens *per se* do not constitute a pathological value if they are accompanied by protective responses (that is, Th1-cell cytokines), whereas Th2-skewed immune responses without adequate Th1 expansion are associated with fungal persistence and allergic diseases, e.g., asthma and ABPA [38–41]. However, we observed a trend toward greater Th2 induction in subjects with chronic occupational mold exposure, which appears to precede serologically detectable mold sensitization (data not shown).

Compared to PBMC-based assays, WB provides a more physiological stimulation environment, allowing us to capture feedback loops between T cells and innate immune cells that can enhance cytokine responses [12]. This might explain why Crf1 and Asp4, which we selected for our WB-based Luminex assay due to their known allergenic properties [19–24], elicited stronger differences in cytokine responses between organic farmers and controls in the Luminex panel than in the ELISPOT assay. Unlike our previous PBMC-based study that found predominantly increased T-cellular cytokine responses in mold-exposed subjects [9], WB stimulation with *A. fumigatus* antigens also induced elevated concentrations of several innate immune cell-derived cytokines in samples from organic farmers. In fact, the 11 most accurate combinations identified by machine learning featured at least one of the innate immune cell markers IL-6, IL-21, and/or MIP-1 α .

Interestingly, IL-6, IL-21, and MIP-1 α have well-characterized roles in shaping Th-cell polarization. For instance, IL-6 inhibits Treg and Th1 activity, supports the differentiation of naive T cells into Th2 and Th17 cells, and can induce IL-4 and IL-13 production by Th2 cells [42–46]. Conversely, MIP-1 α induces Th1 polarization and was shown to prevent the switch from protective Th1 to non-protective Th2 responses to fungal pathogens [47]. Furthermore, the MIP-1 α /MIP-1 β -CCR5 axis is the predominant mechanism of Th-cell and cytotoxic T-cell recruitment by Treg cells in order to suppress effector T-cell activity [48], thereby potentially contributing to protective tolerance to *Aspergillus* antigens in highly exposed subjects. IL-21 is an opponent of Th2 differentiation, inhibits IL-4-induced IgE formation [49–51], and can suppress the immune system through induction of IL-10 secretion in Th1-skewed stimulation environments [52–54]. Consequently, the strong induction of these cytokines in our organic farmer cohort points to a role of innate immune cells and their cytokines in the modulation of T-cellular immune networks in response to mold exposure.

Of note, flow cytometric detection of CD154⁺ AfuLy-reactive Th cells combined with the quantification of IFN- γ , IL-6, and MIP-1 α release had a classification accuracy of 92% between samples from occupationally exposed subjects and controls. This noteworthy high accuracy encourages further exploration of antigen-reactive immune end points

as a bio-effect monitoring approach in subjects with occupational mold exposure [9,10]. However, despite the availability of improved WB-based protocols [18], flow cytometry is not feasible in most routine occupational healthcare settings and is difficult to standardize. Therefore, it would be desirable to entirely replace flow cytometry with WB-based cytokine release assays for bio-effect monitoring of (occupational) mold exposure. Optimized pools of well-defined *A. fumigatus* antigens might allow for improved accuracy of cytokine release assays without concomitant flow cytometry, but the optimal antigens or antigen combinations to efficiently track mold exposure remain elusive. Compared to the mycelial lysate, AspF22, CatB, and CipC displayed markedly greater discriminatory power of Th1 (IFN- γ) and Th2 (IL-5) cytokine responses between the two cohorts in our ELISPOT screen. These results underline the potential benefits of defined protein antigens to improve cytokine monitoring approaches for occupational mold exposure and *Aspergillus*-associated hypersensitivity syndromes, encouraging further testing of these antigens in future studies.

Limitations to this study include the relatively small cohort sizes and lack of prospective validation of the most promising antigens and cytokine combinations in an independent cohort of occupationally exposed subjects. Furthermore, the inclusion of patients with hypersensitivity pneumonitis or mold-induced asthma resulting from occupational exposure would have greatly enhanced this study; however, such samples were not available to the investigators. In addition, as discussed above, Treg cells have important regulatory functions and play a major role in the tolerance of chronic mold exposure and prevention of *Aspergillus*-associated hypersensitivity diseases. The influence of high occupational exposure on Treg responses should therefore be evaluated more thoroughly in future studies. Lastly, we did not assess cytokine responses to other molds that are encountered in agricultural production, e.g., *Alternaria* species [55].

5. Conclusions

Our study provides new insights into the immune alterations induced by intensive or chronic occupational mold exposure. Specifically, we found co-expansion of Th1 and Th2 cell responses in chronically exposed subjects, enhanced expression of innate immune cell cytokines (IL-6, MIP-1 α , and GM-CSF) that correlate with Th1 and Th2 responses, and discrimination of occupationally exposed subjects and controls by cytokine responses to *A. fumigatus* antigens AspF22, CatB, and CipC. Altogether, these results encourage further prospective evaluation of mold-reactive cytokines responses as a potential bio-effect monitoring in occupational health and potential translation to other settings of extensive mold exposures, e.g., after flooding events.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof7090698/s1>. Figure S1: Gating strategy and representative data set for flow cytometric analyses. Figure S2: Subjects with risk factors for mold exposure in their occupational or residential environment display significantly increased *A. fumigatus*-specific T-helper cell frequencies. Figure S3: Heatmaps of median and individual cytokine responses (WB-based Luminex assay) to *A. fumigatus* antigens in samples from organic farmers and controls. Figure S4: Volcano analysis of cytokine responses to *A. fumigatus* antigens identifies a selection of cytokine markers with significant or modest discriminatory power between organic farmers and controls. Figure S5: T-cellular and innate immune cell-derived cytokine responses to AfuLy are strongly correlated in our cohort of organic farmers and controls. Figure S6: Cytokine concentrations detectable by WB-based Luminex analysis modestly differentiate immune responses of organic farmers and controls. Table S1: Oligonucleotides used for the generation of recombinant *A. fumigatus* proteins. Table S2: Preparation of stimulation tubes for whole-blood stimulation.

Author Contributions: Conceptualization, C.D.L., F.E., S.W., and J.L.; methodology, C.D.L., E.S., L.P., S.W., and J.L.; investigation, C.D.L., S.E., E.S., L.P., D.R., M.D., and O.K.; resources, E.S., F.E., O.K., and A.A.B.; data curation, C.D.L., S.S., and S.W.; formal analysis, C.D.L., S.S., and S.W.; writing—original draft preparation, C.D.L. and S.W.; writing—review and editing, F.E. and J.L.; visualization, S.W.; supervision, N.S., G.P., H.E., S.W., and J.L.; project administration, J.L.; funding acquisition, H.E. and J.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the “Deutsche Forschungsgemeinschaft” (Collaborative Research Center/Transregio 124 “Pathogenic fungi and their human host: Networks of interaction—FungiNet”; DFG project number 210879364; project A2 to H.E. and J.L., project A1 to A.A.B., project Z2 to O.K. and project INF to G.P.) and by the Bavarian Ministry of Economics, Media, Energy and Technology (grant number BayBIO-1606-003, “T-cell based diagnostic monitoring of invasive aspergillosis in hematological patients” to J.L.).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committees of the University of Wuerzburg (protocol codes 34/15; 9/3/2015 and 178/16; 18/12/2018).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this manuscript are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors have no conflict of interest related to this study.

References

1. Park, S.J.; Mehrad, B. Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22*, 535–551. [\[CrossRef\]](#)
2. Baxi, S.N.; Portnoy, J.M.; Larenas-Linnemann, D.; Phipatanakul, W.; Environmental Allergens, W. Exposure and Health Effects of Fungi on Humans. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* **2016**, *4*, 396–404. [\[CrossRef\]](#)
3. Twaroch, T.E.; Curin, M.; Valenta, R.; Swoboda, I. Mold allergens in respiratory allergy: From structure to therapy. *Allergy Asthma Immunol. Res.* **2015**, *7*, 205–220. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Latge, J.P.; Chamilos, G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *33*. [\[CrossRef\]](#)
5. Kotimaa, M.H.; Husman, K.H.; Terho, E.O.; Mustonen, M.H. Airborne molds and actinomycetes in the work environment of farmer’s lung patients in Finland. *Scand. J. Work Environ. Health* **1984**, *10*, 115–119. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Liu, S.; Chen, D.; Fu, S.; Ren, Y.; Wang, L.; Zhang, Y.; Zhao, M.; He, X.; Wang, X. Prevalence and risk factors for farmer’s lung in greenhouse farmers: An epidemiological study of 5880 farmers from Northeast China. *Cell Biochem. Biophys.* **2015**, *71*, 1051–1057. [\[CrossRef\]](#)
7. Halpin, D.M.; Graneek, B.J.; Turner-Warwick, M.; Newman Taylor, A.J. Extrinsic allergic alveolitis and asthma in a sawmill worker: Case report and review of the literature. *Occup. Environ. Med.* **1994**, *51*, 160–164. [\[CrossRef\]](#)
8. Faerden, K.; Lund, M.B.; Mogens Aalokken, T.; Eduard, W.; Sostrand, P.; Langard, S.; Kongerud, J. Hypersensitivity pneumonitis in a cluster of sawmill workers: A 10-year follow-up of exposure, symptoms, and lung function. *Int. J. Occup Environ. Health* **2014**, *20*, 167–173. [\[CrossRef\]](#)
9. Page, L.; Weis, P.; Müller, T.; Dittrich, M.; Lazariotou, M.; Dragan, M.; Waaga-Gasser, A.M.; Helm, J.; Dandekar, T.; Einsele, H.; et al. Evaluation of *Aspergillus* and Mucorales specific T-cells and peripheral blood mononuclear cell cytokine signatures as biomarkers of environmental mold exposure. *Int. J. Med Microbiol. IJMM* **2018**, *308*, 1018–1026. [\[CrossRef\]](#)
10. Wurster, S.; Weis, P.; Page, L.; Helm, J.; Lazariotou, M.; Einsele, H.; Ullmann, A.J. Intra- and inter-individual variability of *Aspergillus fumigatus* reactive T-cell frequencies in healthy volunteers in dependency of mould exposure in residential and working environment. *Mycoses* **2017**, *60*, 668–675. [\[CrossRef\]](#)
11. Rosenblum Lichtenstein, J.H.; Hsu, Y.H.; Gavin, I.M.; Donaghey, T.C.; Molina, R.M.; Thompson, K.J.; Chi, C.L.; Gillis, B.S.; Brain, J.D. Environmental mold and mycotoxin exposures elicit specific cytokine and chemokine responses. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0126926. [\[CrossRef\]](#)
12. Lauruschkat, C.D.; Page, L.; White, P.L.; Etter, S.; Davies, H.E.; Duckers, J.; Ebel, F.; Schnack, E.; Backx, M.; Dragan, M.; et al. Development of a Simple and Robust Whole Blood Assay with Dual Co-Stimulation to Quantify the Release of T-Cellular Signature Cytokines in Response to *Aspergillus fumigatus* Antigens. *J. Fungi* **2021**, *7*, 462. [\[CrossRef\]](#)
13. Sabino, R.; Faisca, V.M.; Carolino, E.; Verissimo, C.; Viegas, C. Occupational exposure to *Aspergillus* by swine and poultry farm workers in Portugal. *J. Toxicol. Environ. Health A* **2012**, *75*, 1381–1391. [\[CrossRef\]](#)
14. Barber, A.E.; Riedel, J.; Sae-Ong, T.; Kang, K.; Brabetz, W.; Panagiotou, G.; Deising, H.B.; Kurzai, O. Effects of Agricultural Fungicide Use on *Aspergillus fumigatus* Abundance, Antifungal Susceptibility, and Population Structure. *mBio* **2020**, *11*. [\[CrossRef\]](#)
15. Richardson, M.D.; Page, I.D. *Aspergillus* serology: Have we arrived yet? *Med. Mycol.* **2017**, *55*, 48–55. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Lauruschkat, C.D.; Page, L.; Etter, S.; Schnack, E.; Einsele, H.; Ebel, F.; Loeffler, J.; Wurster, S. Establishment of a whole blood ELISA to quantify T-cellular cytokine release in response to *Aspergillus fumigatus* antigens. In Proceedings of the Advances Against Aspergillosis and Mucormycosis, Lugano, Switzerland, 27–29 February 2020.
17. Lauruschkat, C.D.; Wurster, S.; Page, L.; Lazariotou, M.; Dragan, M.; Weis, P.; Ullmann, A.J.; Einsele, H.; Loeffler, J. Susceptibility of *A. fumigatus*-specific T-cell assays to pre-analytic blood storage and PBMC cryopreservation greatly depends on readout platform and analytes. *Mycoses* **2018**, *61*, 549–560. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

18. Weis, P.; Helm, J.; Page, L.; Lauruschkat, C.D.; Lazariotou, M.; Einsele, H.; Loeffler, J.; Ullmann, A.J.; Wurster, S. Development and evaluation of a whole blood-based approach for flow cytometric quantification of CD154+ mould-reactive T cells. *Med. Mycol.* **2020**, *58*, 187–196. [[CrossRef](#)]
19. Banerjee, B.; Kurup, V.P.; Greenberger, P.A.; Johnson, B.D.; Fink, J.N. Cloning and expression of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 16 mediating both humoral and cell-mediated immunity in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *Clin. Exp. Allergy* **2001**, *31*, 761–770. [[CrossRef](#)]
20. Ramadan, G.; Davies, B.; Kurup, V.P.; Keever-Taylor, C.A. Generation of cytotoxic T cell responses directed to human leucocyte antigen Class I restricted epitopes from the *Aspergillus* f16 allergen. *Clin. Exp. Immunol.* **2005**, *140*, 81–91. [[CrossRef](#)]
21. Jolink, H.; de Boer, R.; Willems, L.N.; van Dissel, J.T.; Falkenburg, J.H.; Heemskerk, M.H. T helper 2 response in allergic bronchopulmonary aspergillosis is not driven by specific *Aspergillus* antigens. *Allergy* **2015**, *70*, 1336–1339. [[CrossRef](#)]
22. Hemmann, S.; Nikolaizik, W.H.; Schoni, M.H.; Blaser, K.; Cramer, R. Differential IgE recognition of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens by cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis or *Aspergillus* allergy. *Eur. J. Immunol.* **1998**, *28*, 1155–1160. [[CrossRef](#)]
23. Kurup, V.P.; Xia, J.Q.; Cramer, R.; Rickaby, D.A.; Choi, H.Y.; Fluckiger, S.; Blaser, K.; Dawson, C.A.; Kelly, K.J. Purified recombinant *A. fumigatus* allergens induce different responses in mice. *Clin. Immunol.* **2001**, *98*, 327–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Du, C.; Wingard, J.R.; Cheng, S.; Nguyen, M.H.; Clancy, C.J. Serum IgG responses against *Aspergillus* proteins before hematopoietic stem cell transplantation or chemotherapy identify patients who develop invasive aspergillosis. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2012**, *18*, 1927–1934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bacher, P.; Heinrich, F.; Stervbo, U.; Nienen, M.; Vahldieck, M.; Iwert, C.; Vogt, K.; Kollet, J.; Babel, N.; Sawitzki, B.; et al. Regulatory T Cell Specificity Directs Tolerance versus Allergy against Aeroantigens in Humans. *Cell* **2016**, *167*, 1067–1078. [[CrossRef](#)]
26. Murdock, B.J.; Shreiner, A.B.; McDonald, R.A.; Osterholzer, J.J.; White, E.S.; Toews, G.B.; Huffnagle, G.B. Coevolution of TH1, TH2, and TH17 responses during repeated pulmonary exposure to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun.* **2011**, *79*, 125–135. [[CrossRef](#)]
27. Schmidt, S.; Ebner, F.; Rosen, K.; Kniemeyer, O.; Brakhage, A.A.; Löffler, J.; Seif, M.; Springer, J.; Schlosser, J.; Scharek-Tedin, L.; et al. The domestic pig as human-relevant large animal model to study adaptive antifungal immune responses against airborne *Aspergillus fumigatus*. *Eur. J. Immunol.* **2020**, *50*, 1712–1728. [[CrossRef](#)]
28. Bacher, P.; Hohnstein, T.; Beerbaum, E.; Rocker, M.; Blango, M.G.; Kaufmann, S.; Rohmel, J.; Eschenhagen, P.; Grehn, C.; Seidel, K.; et al. Human Anti-fungal Th17 Immunity and Pathology Rely on Cross-Reactivity against *Candida albicans*. *Cell* **2019**, *176*, 1340–1355. [[CrossRef](#)]
29. Werner, J.L.; Metz, A.E.; Horn, D.; Schoeb, T.R.; Hewitt, M.M.; Schwiebert, L.M.; Faro-Trindade, I.; Brown, G.D.; Steele, C. Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 4938–4946. [[CrossRef](#)]
30. Rivera, A.; Hohl, T.M.; Collins, N.; Leiner, I.; Gallegos, A.; Saijo, S.; Coward, J.W.; Iwakura, Y.; Pamer, E.G. Dectin-1 diversifies *Aspergillus fumigatus*-specific T cell responses by inhibiting T helper type 1 CD4 T cell differentiation. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 369–381. [[CrossRef](#)]
31. Gresnigt, M.S.; Bozza, S.; Becker, K.L.; Joosten, L.A.; Abdollahi-Roodsaz, S.; van der Berg, W.B.; Dinarello, C.A.; Netea, M.G.; Fontaine, T.; De Luca, A.; et al. A polysaccharide virulence factor from *Aspergillus fumigatus* elicits anti-inflammatory effects through induction of Interleukin-1 receptor antagonist. *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1003936. [[CrossRef](#)]
32. Fontaine, T.; Delangle, A.; Simenel, C.; Coddeville, B.; van Vliet, S.J.; van Kooyk, Y.; Bozza, S.; Moretti, S.; Schwarz, F.; Trichot, C.; et al. Galactosaminogalactan, a new immunosuppressive polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002372. [[CrossRef](#)]
33. Simonian, P.L.; Roark, C.L.; Born, W.K.; O'Brien, R.L.; Fontenot, A.P. Gammadelta T cells and Th17 cytokines in hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. *Transl Res.* **2009**, *154*, 222–227. [[CrossRef](#)]
34. Simonian, P.L.; Roark, C.L.; Wehrmann, F.; Lanham, A.K.; Diaz del Valle, F.; Born, W.K.; O'Brien, R.L.; Fontenot, A.P. Th17-polarized immune response in a murine model of hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 657–665. [[CrossRef](#)]
35. Simonian, P.L.; Roark, C.L.; Wehrmann, F.; Lanham, A.M.; Born, W.K.; O'Brien, R.L.; Fontenot, A.P. IL-17A-expressing T cells are essential for bacterial clearance in a murine model of hypersensitivity pneumonitis. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 6540–6549. [[CrossRef](#)]
36. Andrews, K.; Ghosh, M.C.; Schwingshackl, A.; Rapalo, G.; Luellen, C.; Waters, C.M.; Fitzpatrick, E.A. Chronic hypersensitivity pneumonitis caused by *Saccharopolyspora rectivirgula* is not associated with a switch to a Th2 response. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2016**, *310*, L393–L402. [[CrossRef](#)]
37. Hasan, S.A.; Eksteen, B.; Reid, D.; Paine, H.V.; Alansary, A.; Johannson, K.; Gwozd, C.; Goring, K.A.; Vo, T.; Proud, D.; et al. Role of IL-17A and neutrophils in fibrosis in experimental hypersensitivity pneumonitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2013**, *131*, 1663–1673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Becker, K.L.; Gresnigt, M.S.; Smeekens, S.P.; Jacobs, C.W.; Magis-Escurra, C.; Jaeger, M.; Wang, X.; Lubbers, R.; Oosting, M.; Joosten, L.A.; et al. Pattern recognition pathways leading to a Th2 cytokine bias in allergic bronchopulmonary aspergillosis patients. *Clin. Exp. Allergy* **2015**, *45*, 423–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Moss, R.B. Pathophysiology and immunology of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Med. Mycol.* **2005**, *43* (Suppl. S1), S203–S206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Sehgal, I.S.; Agarwal, R. Specific IgE is better than skin testing for detecting *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in asthma. *Chest* **2015**, *147*, e194. [[CrossRef](#)]
41. de Barros Bezerra, G.F.; Haidar, D.M.; da Silva, M.A.; Filho, W.E.; Dos Santos, R.M.; Rosa, I.G.; de Castro Viana, G.M.; Zaror, L.; Soares Brandao Nascimento Mdo, D. IgE serum concentration against airborne fungi in children with respiratory allergies. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* **2016**, *12*, 18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Neveu, W.A.; Allard, J.B.; Dienz, O.; Wargo, M.J.; Ciliberto, G.; Whittaker, L.A.; Rincon, M. IL-6 is required for airway mucus production induced by inhaled fungal allergens. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 1732–1738. [[CrossRef](#)]
43. Rincon, M.; Anguita, J.; Nakamura, T.; Fikrig, E.; Flavell, R.A. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 461–469. [[CrossRef](#)]
44. Diehl, S.; Rincon, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol. Immunol.* **2002**, *39*, 531–536. [[CrossRef](#)]
45. Bettelli, E.; Carrier, Y.; Gao, W.; Korn, T.; Strom, T.B.; Oukka, M.; Weiner, H.L.; Kuchroo, V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **2006**, *441*, 235–238. [[CrossRef](#)]
46. Kimura, A.; Kishimoto, T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.* **2010**, *40*, 1830–1835. [[CrossRef](#)]
47. Olszewski, M.A.; Huffnagle, G.B.; McDonald, R.A.; Lindell, D.M.; Moore, B.B.; Cook, D.N.; Toews, G.B. The role of macrophage inflammatory protein-1 alpha/CCL3 in regulation of T cell-mediated immunity to *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 6429–6436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Patterson, S.J.; Pesenacker, A.M.; Wang, A.Y.; Gillies, J.; Mojibian, M.; Morishita, K.; Tan, R.; Kieffer, T.J.; Verchere, C.B.; Panagiotopoulos, C.; et al. T regulatory cell chemokine production mediates pathogenic T cell attraction and suppression. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 1039–1051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Ozaki, K.; Spolski, R.; Feng, C.G.; Qi, C.F.; Cheng, J.; Sher, A.; Morse, H.C., 3rd; Liu, C.; Schwartzberg, P.L.; Leonard, W.J. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* **2002**, *298*, 1630–1634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Suto, A.; Nakajima, H.; Hirose, K.; Suzuki, K.; Kagami, S.; Seto, Y.; Hoshimoto, A.; Saito, Y.; Foster, D.C.; Iwamoto, I. Interleukin 21 prevents antigen-induced IgE production by inhibiting germ line C(epsilon) transcription of IL-4-stimulated B cells. *Blood* **2002**, *100*, 4565–4573. [[CrossRef](#)]
51. Lin, P.Y.; Jen, H.Y.; Chiang, B.L.; Sheu, F.; Chuang, Y.H. Interleukin-21 suppresses the differentiation and functions of T helper 2 cells. *Immunology* **2015**, *144*, 668–676. [[CrossRef](#)]
52. Spolski, R.; Kim, H.P.; Zhu, W.; Levy, D.E.; Leonard, W.J. IL-21 mediates suppressive effects via its induction of IL-10. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 2859–2867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Pot, C.; Jin, H.; Awasthi, A.; Liu, S.M.; Lai, C.Y.; Madan, R.; Sharpe, A.H.; Karp, C.L.; Miaw, S.C.; Ho, I.C.; et al. Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 797–801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Doganci, A.; Birkholz, J.; Gehring, S.; Puhl, A.G.; Zepp, F.; Meyer, C.U. In the presence of IL-21 human cord blood T cells differentiate to IL-10-producing Th1 but not Th17 or Th2 cells. *Int. Immunol.* **2013**, *25*, 157–169. [[CrossRef](#)]
55. Bush, R.K.; Portnoy, J.M.; Saxon, A.; Terr, A.I.; Wood, R.A. The medical effects of mold exposure. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2006**, *117*, 326–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3.3.1 Supplement

Chronic occupational mold exposure drives expansion of *Aspergillus*-reactive type 1 and type 2 T-helper cell responses.

Lauruschkat CD, Etter S, Schnack E, Ebel F, Schäuble S, Page L, Rümens D, Dragan M, Schlegel N, Panagiotou G, Kniemeyer O, Brakhage AA, Einsele H., Wurster S#, Loeffler J #.

geteilte Letztautorenschaft

Chronic occupational mold exposure drives expansion of *Aspergillus*-reactive type 1 and type 2 T-helper cell responses

Supplementary Figures and Tables

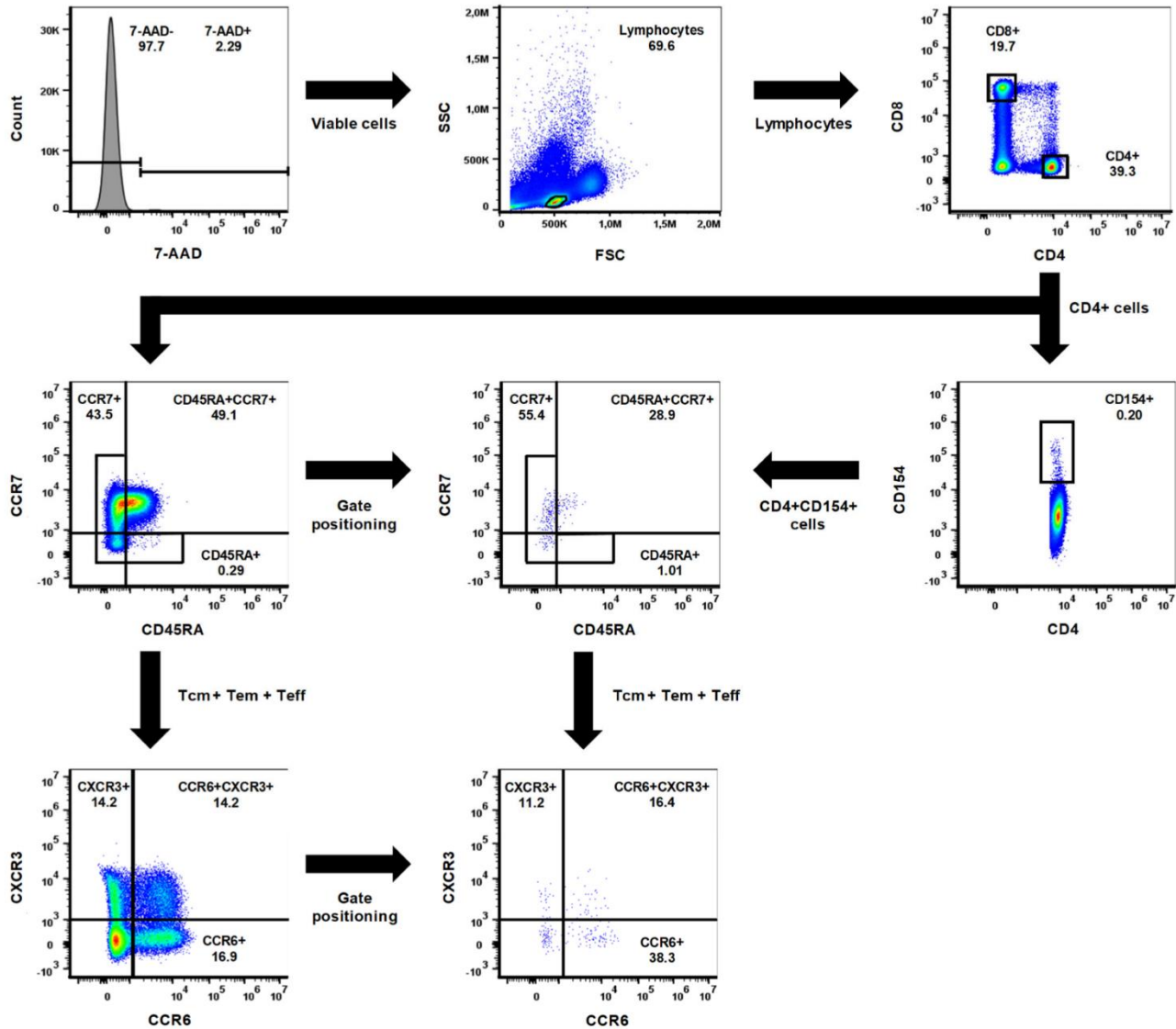


Figure S1. Gating strategy and representative data set for flow cytometric analyses. 7-Aminoactinomycin D (7-AAD)-positive (dead) cells were excluded, lymphocytes were identified by light scatter properties, and CD4⁺ T-helper (Th) cells were gated. Effector Th cells (Teff; CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁻), effector memory Th cells (Tem; CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁻), central memory Th cells (Tcm; CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺), and naive Th cells (CD4⁺CD45RA⁺CCR7⁺) were differentiated among CD4⁺ cells. An additional gate including the Tcm, Tem, and Teff subsets was positioned in order to exclude naive Th cells from subsequent Th1/Th2/Th17 cell differentiation. Thereafter, the non-naïve CD4⁺ cells were subdivided into Th1 cells (CD4⁺CCR6⁻CXCR3⁺), Th2 cells (CD4⁺CCR6⁺CXCR3⁻), Th17 cells (CD4⁺CCR6⁺CXCR3⁺), and others including Th1/Th17-type cells (CD4⁺CCR6⁻CXCR3⁺). Antigen-reactive cells among the total CD4⁺ Th population were identified by CD154 expression. The CD45RA/CCR7 and CCR6/CXCR3 gates were then transferred to the CD4⁺CD154⁺ population in order to define

memory/effector phenotypes and polarization of the antigen-reactive Th cells. Abbreviations: CD = cluster of differentiation, CCR = C-C motive chemokine receptor, CXCR = C-X-C motive chemokine receptor.

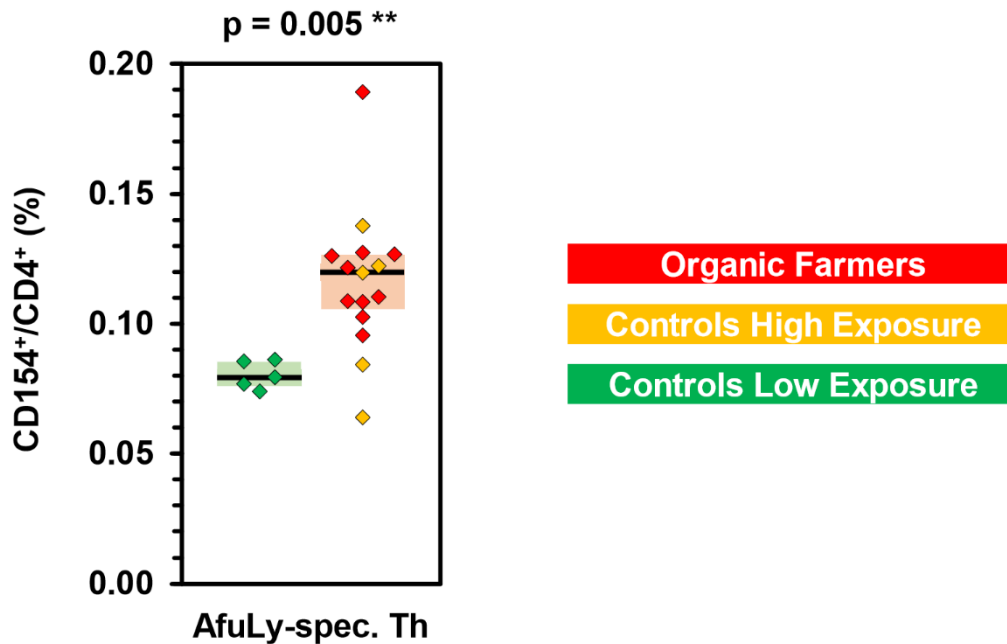


Figure S2. Subjects with risk factors for mold exposure in their occupational or residential environment display significantly increased *A. fumigatus*-specific T-helper cell frequencies. PBMCs from 10 organic farmers (red), 5 control subjects with high residential mold exposure (yellow), and 5 control subjects reporting no significant risk factors for occupational or residential exposure (green) were stimulated with *A. fumigatus* mycelial lysate (AfuLy). Frequencies of CD154⁺ cells among (CD4⁺) T-helper cells were determined by flow cytometry. Unlike in Fig. 1a, subjects are grouped according to our previously reported classification of mold exposure profiles (Wurster et al., 2017, *Mycoses*; Page et al., 2018, *Intern J Med Microbiol*). Individual background-adjusted results, medians (black bars), and inter-quartile ranges (colored boxes) are shown. Two-sided Mann-Whitney-U-test.

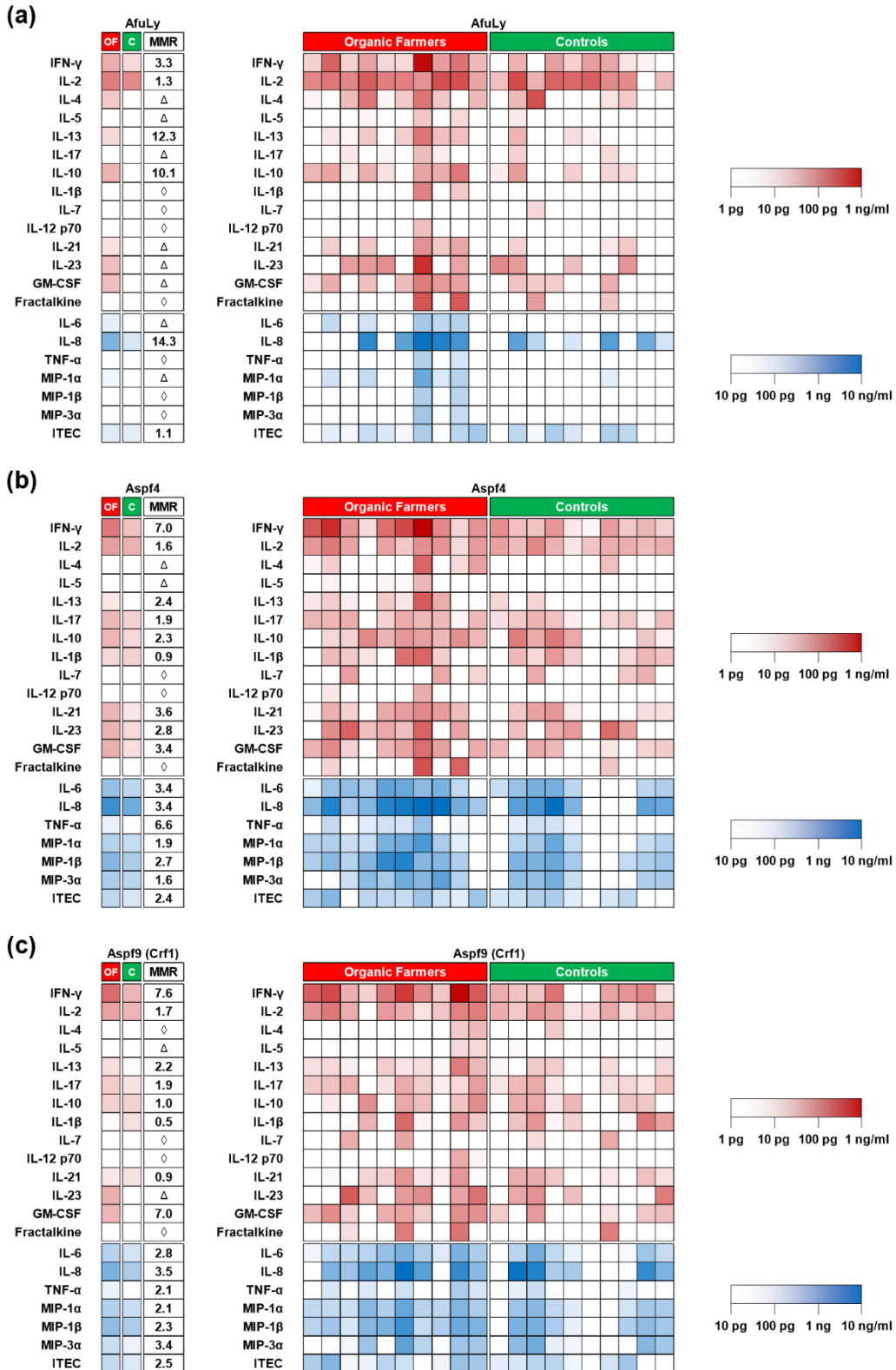


Figure S3. Heatmaps of median and individual cytokine responses (whole blood-based Luminex assay) to *A. fumigatus* antigens in samples from organic farmers and controls. The heatmaps summarize median and individual background-

adjusted cytokine concentrations in organic farmers (“OF”) and control subjects (“C”) depending on the *A. fumigatus* antigen used for stimulation. The numeric values in the MMR column represent median-to-median ratios between the two cohorts, with values >1.0 indicating greater median cytokine concentrations in the organic farmer cohort. Δ denotes infinite median-to-median ratios (median = 0 pg/mL in the control cohort). \diamond denotes undefined median-to-median ratios (median = 0 pg/mL in both cohorts). AfuLy = *A. fumigatus* mycelial lysate.

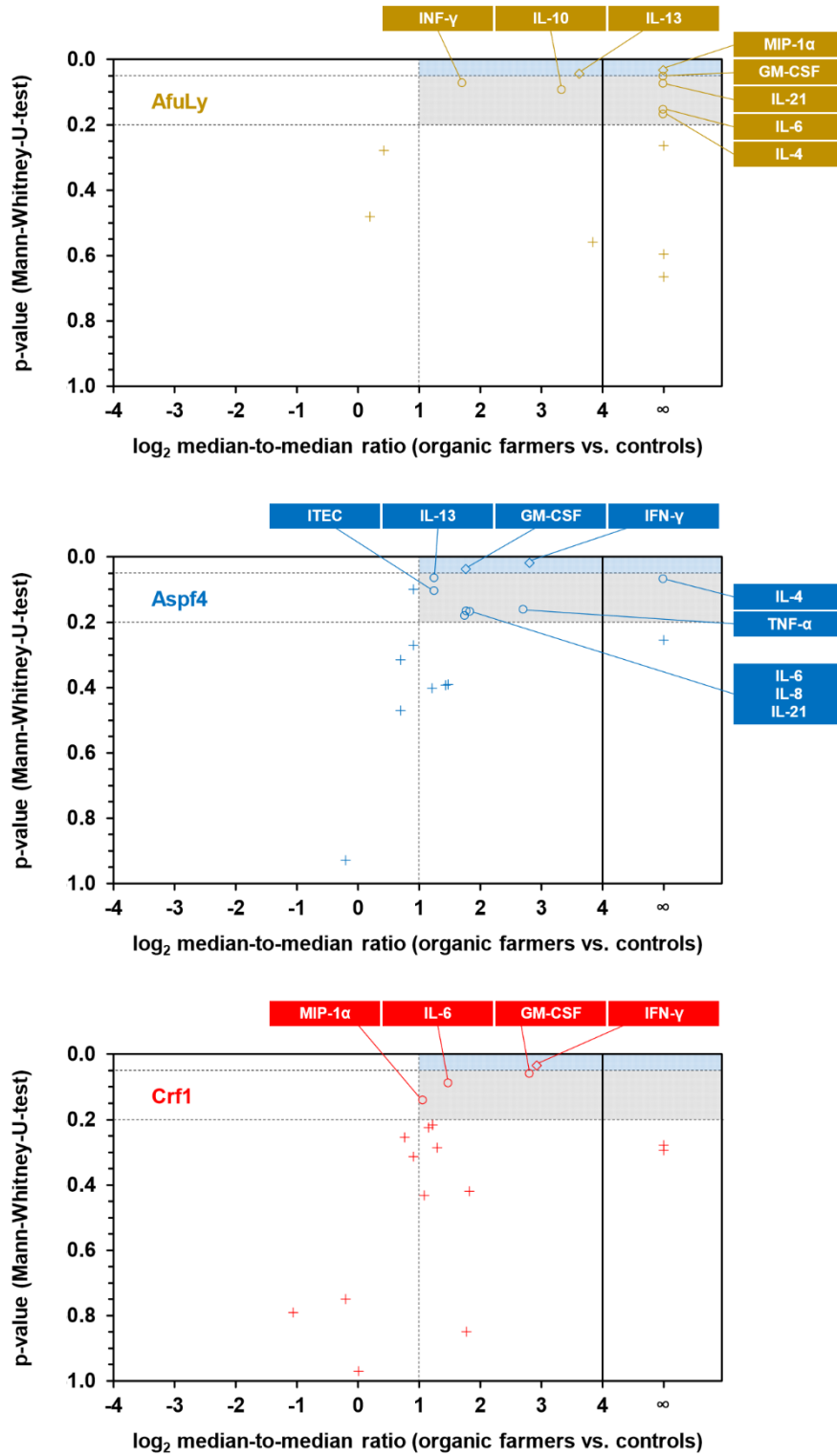


Figure S4. Volcano analysis of cytokine responses to *A. fumigatus* antigens identifies a selection of cytokine markers with significant or modest discriminatory power between organic farmers and controls. The volcano plots compare log₂-transformed ratios of median concentrations for each antigen/cytokine combination in organic farmers and controls (x-values)

with the corresponding p-values (Mann-Whitney-U-test, y-values). Antigen/cytokine pairs are classified as insignificant (“+” symbols, median-to-median ratio < 2 and/or $p > 0.2$), potentially significant (circles, median-to-median ratio > 2 and $0.05 < p < 0.2$), or significant (diamonds, median-to-median ratio > 2 and $p < 0.05$). Cytokine responses with medians of 0 pg/mL in both cohorts are not displayed.

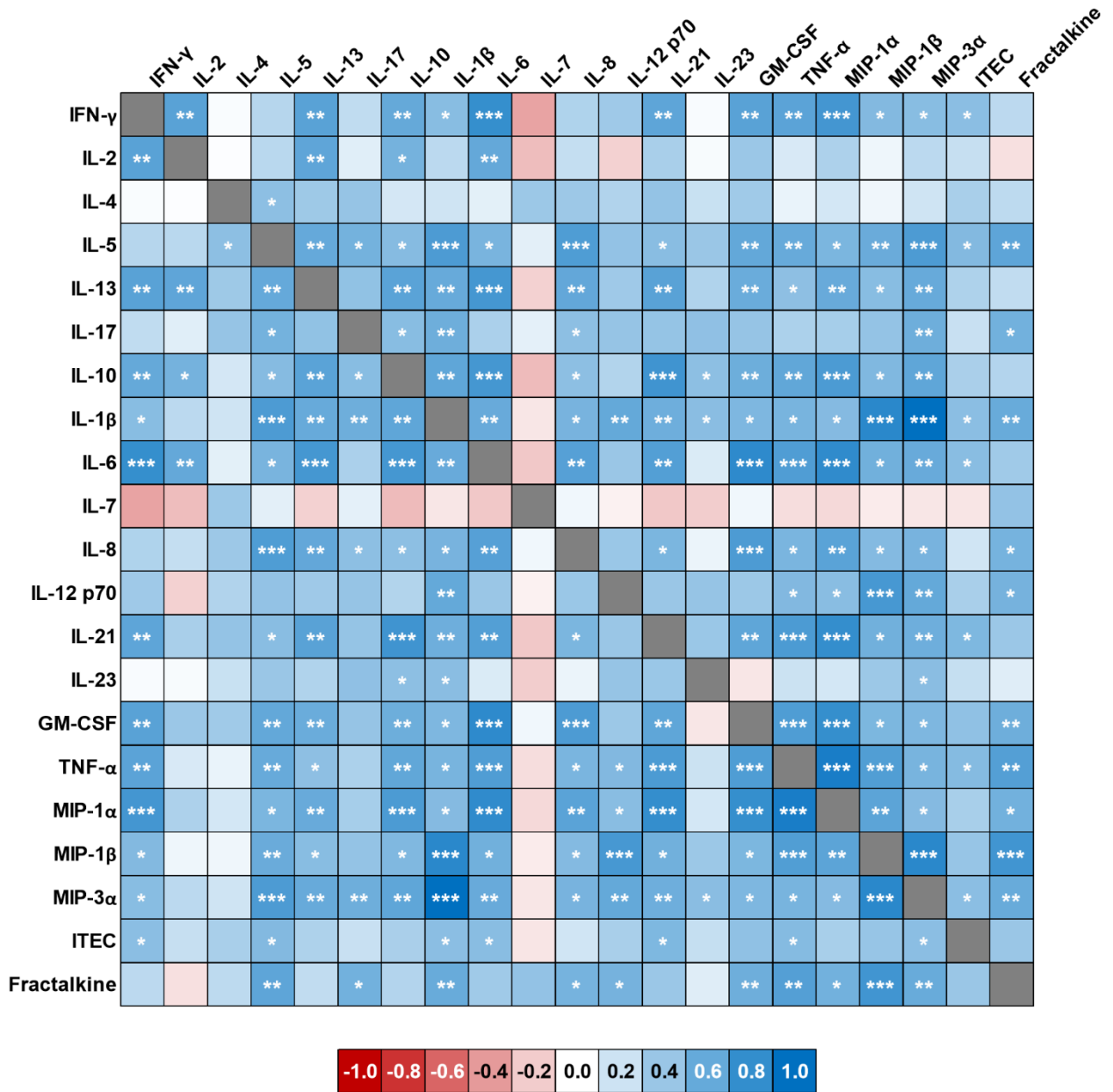


Figure S5. T-cellular and innate immune cell-derived cytokine responses to *A. fumigatus* antigens are strongly correlated in our cohort of organic farmers and controls. Heatmap of Spearman’s rank correlation coefficients of individual cytokine concentrations elicited by *A. fumigatus* mycelial lysate (whole blood-based Luminex assay). FDR-corrected significance of Spearman coefficients is indicated by asterisks. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

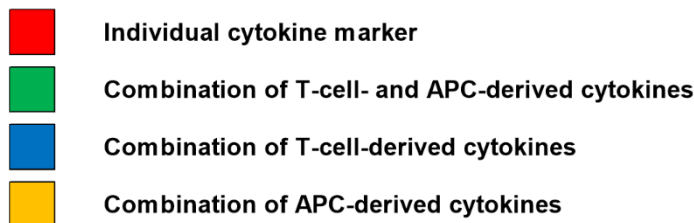
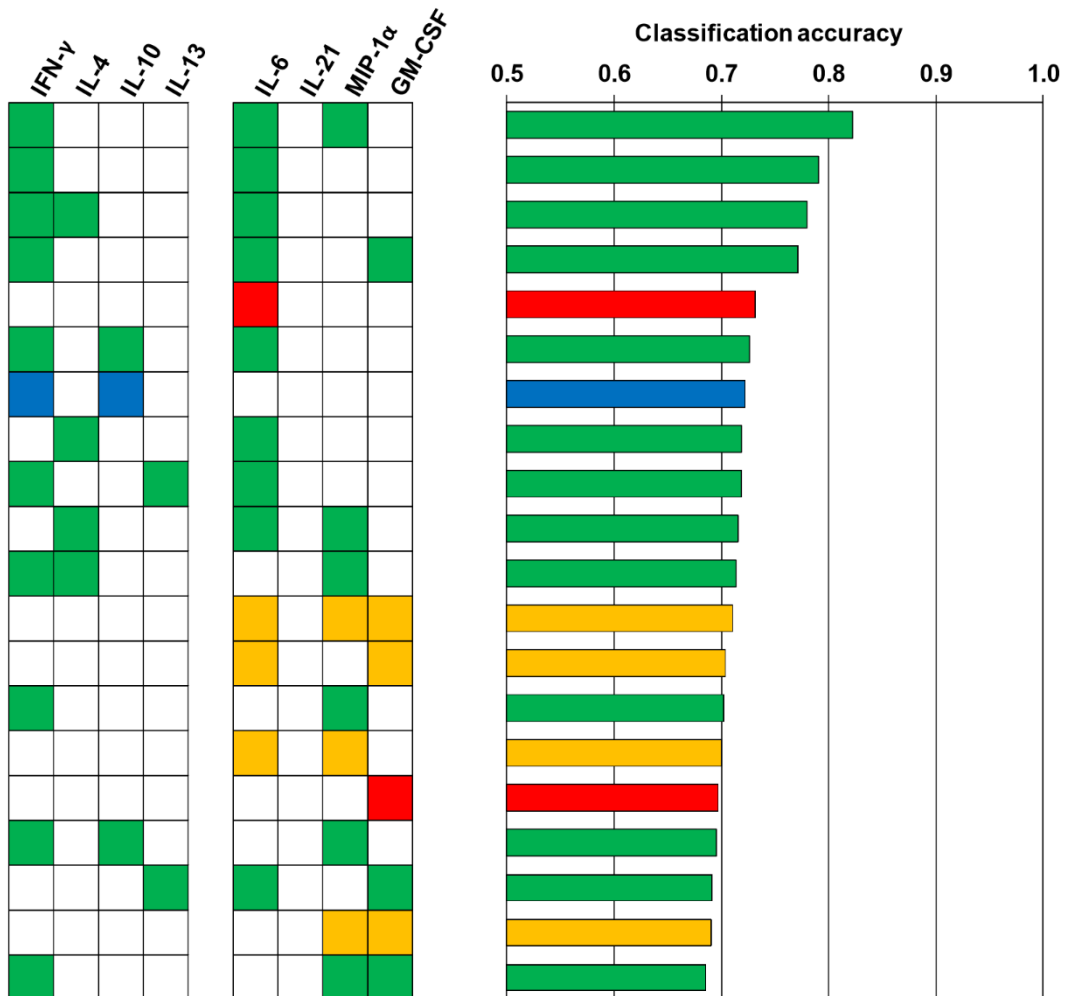


Figure S6. Cytokine concentrations detectable by whole blood-based Luminex analysis modestly differentiate immune responses of organic farmers and controls. The classification accuracy of combinations of up to 3 AfuLy-induced cytokines responses was determined by a random forest algorithm. The top 20 combinations with the highest classification accuracy between organic farmers and controls are shown. Only cytokine markers passing the pre-filtering step (Fig. S4) based on their relative induction in the two cohorts (median-to-median ratio > 2.0) and p-values ($p < 0.2$) were considered. Abbreviations: AfuLy = *A. fumigatus* mycelial lysate, APC = antigen presenting cells.

Table S1. Oligonucleotides used for the generation of recombinant *A. fumigatus* proteins.

Designation	Systematic name	Localization	Forward primer		Reverse primer	
			Restriction sites are indicated by bold fonts.		Restriction sites are indicated by bold fonts.	
Aspf1 (mitogillin)	Afu5g02330	secreted	Aspf1-BamHI-FOR GCAGGATCC ACCTGGACATGCAT CAAC	Aspf1-HindIII-REV GCAA AGCTT CTAATGAGAACACAG TCT		
Aspf3	Afu6g02280	cytosolic	Aspf3-BamHI-FOR CTGGATCC ATGTCTGGACTCAAG GCCGGT	Aspf3-HindIII-REV GCAA AGCTT TTTACAGGTGCTTGAG GACGGT		
Aspf4	Afu2g03830	secreted	Aspf4-BamHI-FOR CAGGATCC CACGAGCGCCGCCAC CTCCAC	Aspf4-HindIII-REV GCAA AGCTT CTACTCCTTGTAGTCG AGGTT		
Aspf6 (MnSOD)	Afu1g14550	mitochondrial	Aspf6-BamHI-FOR AGGGTACC ATGTACAGCAATAC ACG	Aspf6-HindIII-REV GCAA AGCTT CTACAGCTTCATGAA TGG		
Aspf8	Afu2g10100	cytosolic	Aspf8-BamHI-FOR GCGGATCC TCTCTGAGGATGTCA AGGCC	Aspf8-HindIII-REV AGCA AGCTT TTTAGTCGAAAAGACC GAAGCC		
Aspf9	Afu1g16190	secreted / cell wall	Aspf9-BamHI-FOR CTGGATCC AAGACCTGCCCGCCC AACAAG	Aspf9-HindIII-REV ACTA AGCTT TTTAGAATGCCAACAC GGCAG		
Aspf22 (enolase)	Afu6g06770	cytoplasm	Eno-BamHI-FOR CGGGATCC ATGCCTATCTCCAAG ATC	Eno-PstI-REV GCG CTGCAG TTACAGGTTGACGGC AGT		
CatB (catalase)	Afu3g02270	secreted / cell wall	Cat1-BamHI-FOR CAGGATCC GTATGTCCCTATATGA CC	Cat1-KpnI-REV AGGGT ACC CTCGATTGCATCGTGC AA		
CipC	Afu5g09330	cytoplasm	CipC-BamHI-FOR CAGGATCC ATGGCTTGGGGCTGG	CipC-HindIII-REV GCAA AGCTT TTTACCAACGGTTCGAC		
CsnB (chitosanase B)	Afu4g01290	secreted	CsnB-BamHI-FOR TAGGATCC TATAATTTGCCCAACAGTAA AGCTT AC	CsnB-HindIII-REV TCTATGCTTTCAAACCA GC		
Hly (hemolysin)	Afu3g00590	secreted	Hly-BamHI-FOR CAGGATCC ATGGCATCGGTCCAA GCT	Hly-KpnI-REV AGGGT ACCTC AGCGCTTCCTCCA AC		

Pst2	Afu1g02820	cytoplasm	Pst2-BamHI-FOR	Pst2-HindIII-REV
			CAGGATCCTACTCCATGTACGGCC	GCAAAGCTTTCACGCGAAGTTGAC
			AC	CTT

Abbreviations: Aspf = *Aspergillus fumigatus* allergen, BamHI = *Bacillus amyloliquefaciens* restriction endonuclease HI, CipC = concanamycin-induced protein C, Eno = enolase, FOR = forward, HindIII = *Haemophilus influenzae* restriction endonuclease DIII, KpnI = *Klebsiella pneumoniae* restriction endonuclease I, MnSOD = manganese superoxide dismutase, PstI = *Providencia stuartii* restriction endonuclease I, Pst2 = oxidative stress response protein 2, REV = reverse.

Table S2. Preparation of stimulation tubes for whole blood stimulation. .

	α -CD28	α -CD49d	AfuLy	Protein antigens	PHA
Concentration in the ready-to-use stimulation tube	2 μ g/mL	2 μ g/mL	100 μ g/mL	60 μ g/mL	20 μ g/mL
Final concentration after injection of 500 μL whole blood	1 μ g/mL	1 μ g/mL	50 μ g/mL	30 μ g/mL	10 μ g/mL
Unstimulated background control	X	X			
AfuLy stimulation	X	X	X		
<i>Aspergillus</i> protein stimulation	X	X		X	
Positive control					X

X indicates that the reagent was used for the respective stimulation mix. The volume of the stimulation mix in the ready-to-use tubes was adjusted to 500 μ L with RPMI 1640. Abbreviations: α = anti, AfuLy = *Aspergillus fumigatus* mycelial lysate, CD = cluster of differentiation, PHA = phytohemagglutinin, RPMI = Roswell Park Memorial Institute.

3.4 Kapitel 4: T-Cell Immune Surveillance in Allogenic Stem Cell Transplant Recipients: Are Whole Blood-Based Assays Ready to Challenge ELISPOT?

Autorenliste:

Lauruschkat CD*, Page L*, Etter S, Weis P, Gamon F, Kraus S, Einsele H., Wurster S#, Loeffler J#.

* geteilte Erstautorenschaft, # geteilte Letztautorenschaft

Journal:

Open Forum Infect Dis. (ISSN: 2328-8957)

Open Forum Infectious Diseases



Ausgabe:

2020 Nov 8;8(1):ofaa547, eCollection 2021 Jan.

Doi:

<https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa547>

Sekundäre Veröffentlichung:

Die sekundäre Veröffentlichung findet mit der schriftlichen Genehmigung des Journals statt.

T-Cell Immune Surveillance in Allogenic Stem Cell Transplant Recipients: Are Whole Blood–Based Assays Ready to Challenge ELISPOT?

Chris D. Lauruschkat,^{1,a} Lukas Page,^{1,a} Sonja Etter,¹ Philipp Weis,¹ Florian Gamon,¹ Sabrina Kraus,¹ Hermann Einsele,¹ Sebastian Wurster,^{2,a,*} and Juergen Loeffler^{1,a}

¹Department of Internal Medicine II, University Hospital Wuerzburg, Wuerzburg, Germany, and

²Department of Infectious Diseases, Infection Control and Employee Health, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA

We compared the feasibility of 4 cytomegalovirus (CMV)- and *Aspergillus*-reactive T-cell immunoassay protocols in allogenic stem cell transplant recipients. While enzyme-linked immunospot performed best overall, logistically advantageous whole blood–based assays performed comparably in patients with less severe lymphocytopenia. CMV-induced interferon-gamma responses correlated strongly across all protocols and showed high concordance with serology.

Keywords. immunoassay; biomarker; aspergillosis; cytomegalovirus; T cells; cytokines; flow cytometry; ELISPOT.

Opportunistic infections including cytomegalovirus (CMV) disease and invasive aspergillosis cause significant morbidity and mortality in allogenic hematopoietic stem cell transplant (allo-HSCT) recipients [1, 2]. A plethora of commercial and investigational T-cell immunoassays have been proposed to support the diagnosis of opportunistic infections in these highly vulnerable patients, with flow cytometry, enzyme-linked immunospot (ELISPOT), and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) being the most common modalities [3–6]. Furthermore, several studies have shown a prognostic value of T-cellular biomarkers, especially antigen-reactive interferon-gamma (IFN- γ) responses, which may facilitate individualized approaches for infection surveillance and prophylactic pharmacotherapy [5, 6].

As systematic comparisons of immunoassay modalities are scarce, we sought to comparatively evaluate the feasibility of 4 CMV- and *Aspergillus fumigatus*-specific T-cell assay protocols (Supplementary Material 1) in allo-HSCT recipients. This cohort is notoriously challenging for immunoassays due to quantitative and qualitative aberrations of the leukocyte repertoire and immunosuppressive pharmacotherapy [7–10]. The specific end points of our study were the technical quality of the results, the concordance of pp65-specific IFN- γ responses with CMV serostatus and infection, and the correlation of results across the studied protocols.

METHODS

Patient Characteristics

Heparinized venous blood (30 mL) was obtained at 3 different time points after allo-HSCT (Supplementary Material 1). Thirteen patients (age 35–69 years, 8 male, 5 female) were enrolled, and 35 samples were available overall. For 2 patients, only the first sample could be collected before follow-up was lost. Detailed patient characteristics are provided in Supplementary Material 2.

Immunoassays

Five hundred-microliter aliquots of heparinized blood were injected into ready-to-use stimulation tubes for whole blood (WB)-based flow cytometry and ELISA [8, 11, 12]. The remainder of the blood was used to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) for flow cytometry and ELISPOT (Supplementary Material 1). Stimulation with an *A. fumigatus* mycelial lysate [13] or CMV pp65 (Lophius Biosciences) was performed according to previously optimized protocols [8, 11, 12, 14]. All assays used dual α -CD28/ α -CD49d co-stimulation except PBMC-based flow cytometry, which only used α -CD28, as described before [11, 14]. Unspecific background controls (“nil”) contained co-stimulatory factors but no antigens. Phytohemagglutinin (Sigma-Aldrich) served as a positive control. Flow cytometric samples were stained with α -CD4-FITC, α -IFN- γ -PE, and α -CD154-APC (Miltenyi Biotec), measured on a FACS Calibur flow cytometer (BD), and analyzed with FlowJo software. ELISPOT was performed using the T-Track CMV platform (Lophius Biosciences), and numbers of spot-forming cells (SFCs) were quantified with a Bioreader 5000a (BioSYS). For WB-ELISA, IFN- γ concentrations in plasma supernatants were quantified using ELISA-Max Deluxe Sets (Biolegend) and a NanoQuant Infinite 200M Pro microplate reader (Tecan). Detailed descriptions of the assays are provided in Supplementary Materials 3–5. Representative data for flow cytometry and ELISPOT are shown in Supplementary

Received 1 September 2020; editorial decision 2 November 2020; accepted 5 November 2020.

^aEqual contribution

Correspondence: S. Wurster, MD, Department of Infectious Diseases, Infection Control and Employee Health, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, 6565 MD Anderson Boulevard, Z8.3002, Houston, TX 77030 (stwurster@mdanderson.org).

Open Forum Infectious Diseases® 2020

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com
DOI: 10.1093/ofid/ofaa547

Materials 6 and 7. Technical acceptance criteria are summarized in Supplementary Material 8A.

Statistics

All immunoassay results presented in this manuscript are adjusted for unspecific background by subtraction of CD154 and/or IFN- γ response in “nil” controls. The binary classification efficacy depending on CMV serostatus and/or infection was determined with receiver operating characteristics analysis. Correlation of results across different protocols was assessed by Spearman’s rank correlation. Applicable significance tests are specified in the figure legends. Statistical analyses and data visualization were performed using GraphPad Prism, version 8, and Microsoft Excel.

RESULTS AND DISCUSSION

Considering all time points and antigens, CD154-based flow cytometry had 41% and 53% technical success rates for PBMCs and WB, respectively, with insufficient acquired CD4 cell numbers and elevated unspecific background being the predominant causes of nonevaluable measurements (Figure 1A). These results are consistent with an earlier report for *Aspergillus*-reactive T-cell quantification in high-risk patients [7]. Unlike in healthy donors [11], the WB-based assay produced more measurements with mildly increased background in allo-HSCT recipients. Adding IFN- γ as a second activation marker, technical performance improved to 63% (PBMCs) and 76% (WB), respectively (Figure 1A), largely due to mitigation of unspecific reactivity. The higher success rate of the WB assay is likely attributable to dual co-stimulation, which we recently recommended to attenuate the impact of immunosuppressive agents on CD154⁺ antigen-reactive T-cell quantification [8]. As these results were not available before the present study, dual co-stimulation was not used for PBMC-based flow cytometry; thus, our data may underestimate the actually achievable performance.

In line with prior reports [6, 15], ELISPOT produced few nonevaluable results (7%) (Figure 1A), mainly due to elevated unspecific background. WB-ELISA performed comparably to CD154⁺IFN- γ ⁺ WB flow cytometry, with 74% successful measurements. The feasibility of both WB-based assays improved with increasing time after HSCT (Figure 1B; Supplementary Material 9) and increasing lymphocyte counts (Figure 1B). Of note, CD154⁺IFN- γ ⁺ WB flow cytometry and WB-ELISA were noninferior to ELISPOT in patients with >400 and >800 lymphocytes/ μ L, respectively (Figure 1B). The higher number of WB-ELISA than ELISPOT measurements with insufficient responses to the positive control in strongly lymphopenic patients is consistent with prior reports for commercial IFN- γ release assays [16, 17]. Unlike our study, some commercial platforms for CMV immunoassays [18, 19] do not apply specific cutoffs to the unstimulated control and/or use positive controls

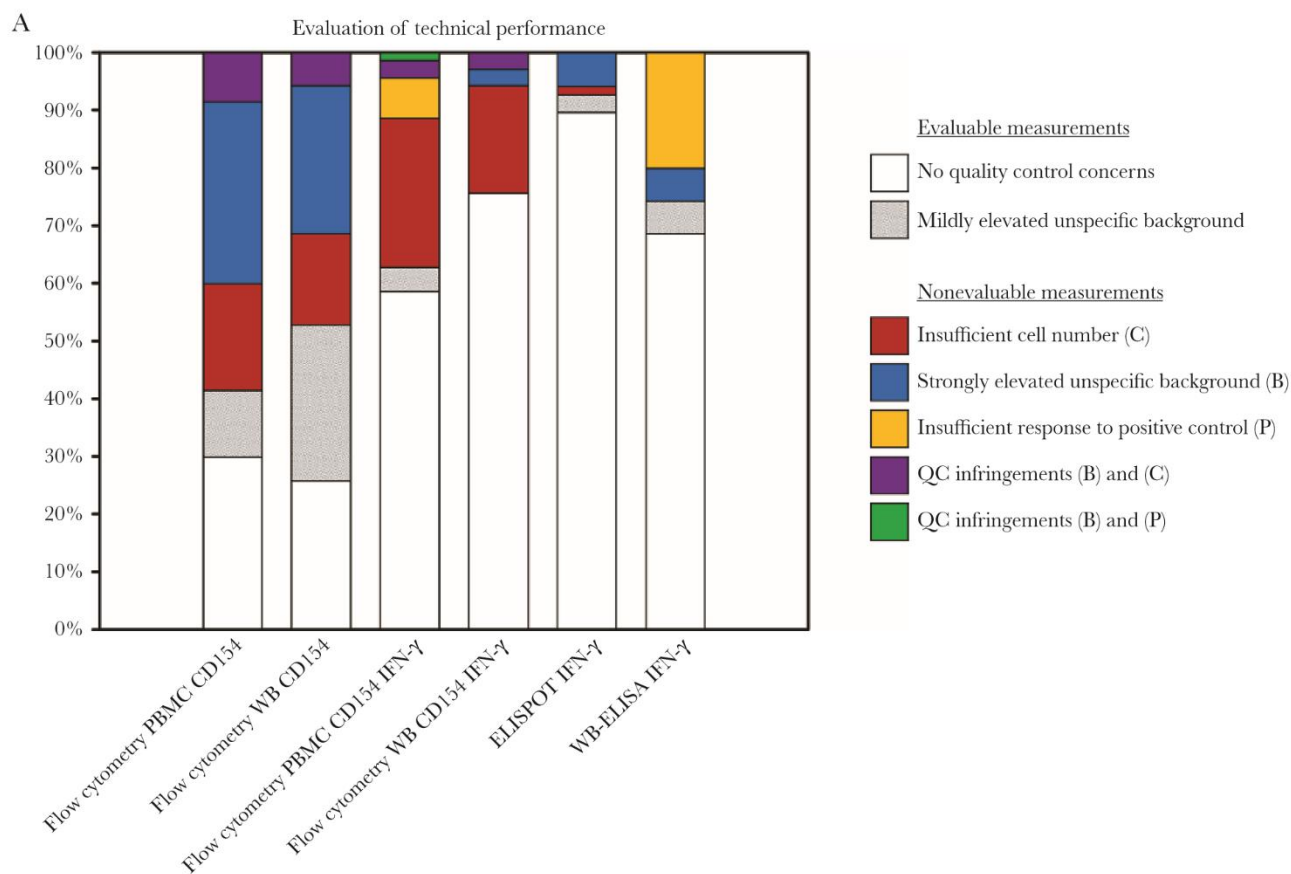
only to validate measurements that are nonreactive to the antigen of interest (Supplementary Material 8B). Applying stricter requirements, our data therefore provide a rather conservative estimation of the success rate of the investigational protocols, especially for WB-ELISA.

None of the enrolled patients developed possible or probable invasive mold infections during the study period (Supplementary Material 2). Consistently, the patients’ distributions of CD154⁺ *A. fumigatus*-reactive T-cell frequencies and IFN- γ responses (Supplementary Material 10) were similar or slightly lower than those observed in healthy subjects [11, 20, 21].

Concordance of test results with serology is commonly used to validate CMV-specific T-cell assays [22, 23]. In our study, all 4 IFN- γ assays showed excellent concordance with serology (Figure 2A). Only 1 false-positive measurement was observed for PBMC-based flow cytometry. Plausible CMV-induced IFN- γ kinetics, especially for ELISPOT and WB-ELISA, were seen in a patient with an asymptomatic primary CMV infection before the first T-cell measurement (Figure 2B). Importantly, poor IFN- γ response to CMV antigens in seropositive patients (with reactive positive controls) does not indicate technical failure, but is considered a prognostic indicator of an increased risk of CMV reactivation or disease in allo-HSCT recipients [6, 15]. Although data are limited, the IFN- γ responses of 2 patients who experienced PCR-documented CMV reactivation clustered at the bottom of the range for seropositive patients in both WB-based assays but not ELISPOT (Figure 2A and C).

High correlation of IFN- γ response to CMV ($P = .74-.88$, $P < .001$) (Supplementary Material 11) and good concordance of test outcomes (80%–96%) (Supplementary Material 12) were found across all assays. Of note, our retrospectively determined cutoffs for antigen reactivity closely resembled those of representative commercial protocols for both ELISPOT [19, 24] and WB-ELISA [18] (Supplementary Material 8).

In summary, while ELISPOT had the highest success rate overall, our investigational WB-based IFN- γ assays performed comparably in patients with less severe lymphopenia. Additional considerations could tip the balance toward WB-based modalities. On one hand, as extensively discussed elsewhere [11], the logistical advantages, cost-effectiveness, and easier translatability to the bedside may favor WB-based protocols. Moreover, this study was performed in an investigational setting with short pre-analytic delays. Therefore, the relative performance in the clinical routine may shift toward more robust WB-based protocols [11], especially when encountering long sample transportation times or when testing cytokines that require prolonged stimulation (eg, IL-17) [25]. Although least robust, flow cytometry retains the advantage of an essentially infinite spectrum of assayable activation markers beyond cytokine induction. Similarly, the output of WB-ELISA can be maximized by using multiplex cytokine panels, whereas options



B

	Week post-transplant (visit)			Lymphocyte count/ μL		
	7–11 (V1)	11–15 (V2)	18–25 (V3)	≤ 400	401–800	> 800
Flow cytometry PBMC CD154	38%	45%	41%	0%	54%	67%
Flow cytometry WB CD154	50%	45%	64%	14%	75%	67%
Flow cytometry PBMC CD154 IFN- γ	58%	77%	55%	27%	75%	83%
Flow cytometry WB CD154 IFN- γ	73%	73%	82%	41%	92%	92%
ELISPOT IFN- γ	96%	100%	82%	85%	92%	100%
WB-ELISA IFN- γ	54%	91%	82%	64%	58%	100%

Figure 1. Comparative technical performance of T-cell immunoassays in allo-HSCT recipients. A, Summary of technical performance and quality control infringements (as defined in [Supplementary Material 8A](#)) for each assay considering all sampling time points and both stimuli (*Aspergillus fumigatus* mycelial lysate and CMV pp65). B, Technical success rates of each protocol depending on the sampling period and the patient's lymphocyte count. Abbreviations: allo-HSCT, allogeneic hematopoietic stem cell transplant; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ELISPOT, enzyme-linked immunospot; IFN, interferon; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; WB, whole blood.

for multiplexing in ELISPOT assays are limited. Consequently, larger PBMC quantities are needed for more comprehensive ELISPOT analyses to stimulate multiple plates containing different (combinations of) detection antibodies.

Several limitations of this small-scale study need to be considered. Although considered inferior to CD4 cell activation markers in predicting clinically significant CMV events [26, 27], inclusion of CD8-specific flow cytometry parameters (eg, CD107a) may have been interesting. While not feasible due to

limited blood volumes, inclusion of additional antigens (eg, IE-1) would have allowed for a more comprehensive analysis of the anti-CMV T-cell response. Furthermore, we did not include an early measurement during the first 6 weeks after allo-HSCT, as considerable blood volumes would have been required to perform all 4 immunoassays simultaneously during a period of early T-cell recovery. Lastly, our findings may not be transferrable to other centers using different regimens for GvHD prophylaxis and to other cohorts with hematological malignancies.

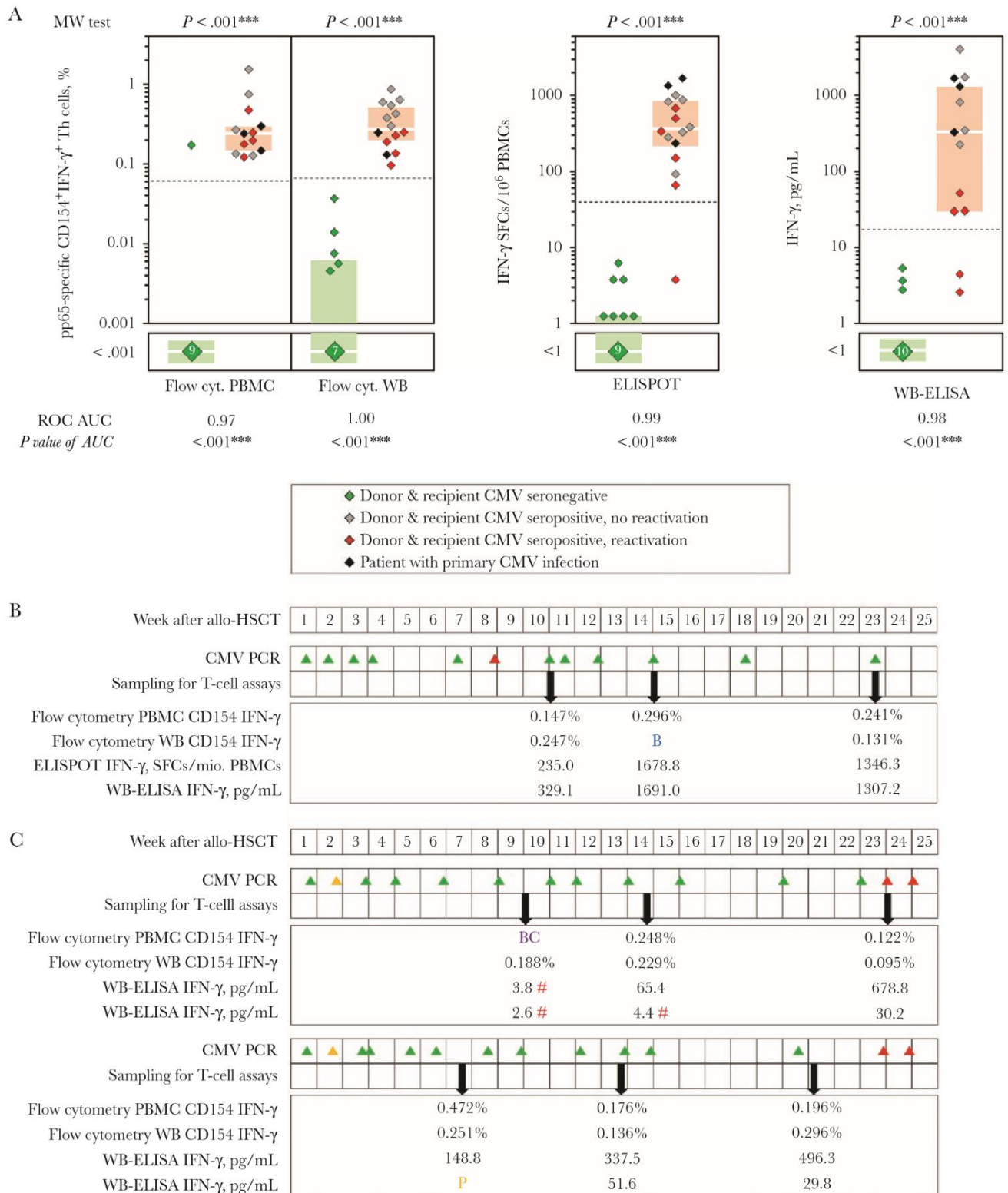


Figure 2. Concordance of CMV-induced IFN- γ responses with CMV serology and infection. A, CMV-induced IFN- γ response detectable by flow cytometry (CD154⁺IFN- γ ⁺/CD4⁺ cells), ELISPOT (IFN- γ spot-forming cells per million PBMCs), and WB-ELISA (IFN- γ pg/mL) depending on the patient's CMV status (colored diamonds). Numbers in large green diamonds indicate the number of nonreactive measurements (no antigen-reactive response exceeding the "nil" control or <0.001% specific T cells detectable by flow cytometry). White horizontal bars and colored boxes represent medians and interquartile ranges, respectively. Dashed lines indicate the retrospectively determined cutoffs for test positivity. *P* values above the panels were determined using the 2-sided Mann-Whitney *U* test. B, Kinetics of CMV-induced IFN- γ responses in a CMV-seronegative patient (#7 in [Supplementary Material 2](#)) who had a positive CMV PCR blood test (red triangle) on day +56 (week 8) and subsequently received valganciclovir therapy. All other CMV PCR blood tests during the study period were negative (green triangles). The second WB-based flow cytometry test was nonevaluable due to elevated unspecific

Despite these limitations, our study provides important insights into the comparative technical performance of different platforms for (investigational) T-cell immunoassays in allo-HSCT recipients. The relatively high technical success rate, good concordance of CMV pp65-specific IFN- γ response and serostatus, and excellent correlation of test results across all protocols are encouraging for the continued investigation and, eventually, clinical translation of T-cellular immune surveillance of opportunistic infections in allo-HSCT recipients. Further in-depth comparison of ELISPOT and WB-based assays in larger studies evaluating additional antigens and cytokines could open new avenues for individualized immune-monitoring approaches. In particular, our results support the selection of optimal immunoassay modalities based on blood count parameters, for example, for future large-scale studies to evaluate protective T-cell responses as part of CMV surveillance algorithms [10].

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *Open Forum Infectious Diseases online*. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

Acknowledgments

We would like to thank Lubov Darst for her effort and commitment in the acquisition of patient samples.

Financial support. This study was funded by the German Research Foundation (DFG) through the TR 124 FungiNet, “Pathogenic fungi and their human host: Networks of Interaction” (DFG project number 210879364, Project A2 to H.E. and J.L.) and by the Bavarian Ministry of Economics, Media, Energy and Technology (grant number BayBIO-1606-003, “T-cell based diagnostic monitoring of invasive aspergillosis in haematological patients” to J.L.).

Potential conflicts of interest. The authors have no conflicts of interest related to this study. Lophius Biosciences kindly provided the ELISPOT plates for this study. All authors: no reported conflicts of interest. All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

Author contributions. C.D.L., P.W., S.W., and J.L. conceived the study and planned the experiments. C.D.L., L.P., and S.E. performed the experiments. C.D.L. and S.W. analyzed and visualized the data. F.G. and S.K. were responsible for patient acquisition and compilation of clinical data. C.D.L. and S.W. wrote the paper. H.E., S.W., and J.L. supervised the study. H.E. and J.L. acquired funding. All authors provided revisions and approved the final version of the manuscript.

Patient consent. The study was approved by the Ethics Committees of the University of Wuerzburg (protocol 178/16). Written informed consent was obtained from all patients.

References

1. Cho SY, Lee DG, Kim HJ. Cytomegalovirus infections after hematopoietic stem cell transplantation: current status and future immunotherapy. *Int J Mol Sci* **2019**; 20:2666.
2. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect* **2018**; 24:e1–38.
3. Bacher P, Steinbach A, Kniemeyer O, et al. Fungus-specific CD4(+) T cells for rapid identification of invasive pulmonary mold infection. *Am J Respir Crit Care Med* **2015**; 191:348–52.
4. Potenza L, Vallerini D, Barozzi P, et al. Characterization of specific immune responses to different *Aspergillus* antigens during the course of invasive aspergillosis in hematologic patients. *PLoS One* **2013**; 8:e74326.
5. Yong MK, Cameron PU, Slavin M, et al. Identifying cytomegalovirus complications using the quantiferon-CMV assay after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Dis* **2017**; 215:1684–94.
6. Chemaly RF, El Haddad L, Winston DJ, et al. Cytomegalovirus (CMV) cell-mediated immunity and CMV infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation: the REACT study. *Clin Infect Dis*. **In press**.
7. Steinbach A, Cornely OA, Wisplinghoff H, et al. Mould-reactive T cells for the diagnosis of invasive mould infection—a prospective study. *Mycoses* **2019**; 62: 562–9.
8. Page L, Lauruschkat CD, Helm J, et al. Impact of immunosuppressive and antifungal drugs on PBMC- and whole blood-based flow cytometric CD154(+) *Aspergillus fumigatus* specific T-cell quantification. *Med Microbiol Immunol*. **In press**.
9. Potenza L, Vallerini D, Barozzi P, et al. Mucorales-specific T cells in patients with hematologic malignancies. *PLoS One* **2016**; 11:e0149108.
10. Neshler L, Shah DP, Ariza-Heredia EJ, et al. Utility of the enzyme-linked immunospot interferon-gamma-release assay to predict the risk of cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplant recipients. *J Infect Dis* **2016**; 213:1701–7.
11. Weis P, Helm J, Page L, et al. Development and evaluation of a whole blood-based approach for flow cytometric quantification of CD154+ mould-reactive T cells. *Med Mycol* **2020**; 58:187–196.
12. Lauruschkat CD, Page L, Etter S, et al. Establishment of a whole blood ELISA to quantify T-cellular cytokine release in response to *Aspergillus fumigatus* antigens. Paper presented at: Proceedings of Advances Against Aspergillosis and Mucormycosis; Lugano, Switzerland, 27–29 February 2020.
13. Bacher P, Hohnstein T, Beerbaum E, et al. Human anti-fungal Th17 immunity and pathology rely on cross-reactivity against *Candida albicans*. *Cell* **2019**; 176:1340–55.
14. Lauruschkat CD, Wurster S, Page L, et al. Susceptibility of *A. fumigatus*-specific T-cell assays to pre-analytic blood storage and PBMC cryopreservation greatly depends on readout platform and analytes. *Mycoses* **2018**; 61:549–60.
15. Wagner-Drouet E, Teschner D, Wolschke C, et al. Standardized monitoring of cytomegalovirus-specific immunity can improve risk stratification of recurrent cytomegalovirus reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. **In press**.
16. Giulieri S, Manuel O. QuantiFERON[®]-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert Rev Mol Diagn* **2011**; 11:17–25.
17. Kumar D, Chernenko S, Moussa G, et al. Cell-mediated immunity to predict cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* **2009**; 9:1214–22.
18. QuantiFERON. QuantiFERON-CMV package insert. Available at: <https://www.quantiferon.com/wp-content/uploads/2018/10/L1075110-R05-QF-CMV-ELISA-IFU-CE.pdf>. Accessed 26 August 2020.
19. Oxford Immunotec. T-Spot.CMV package insert. Available at: <http://www.oxfordimmunotec.com/international/wp-content/uploads/sites/3/PI-CMV-IVD-UK-V2.pdf>. Accessed 26 August 2020.
20. Wurster S, Weis P, Page L, et al. Intra- and inter-individual variability of *Aspergillus fumigatus* reactive T-cell frequencies in healthy volunteers in dependency

background (B). The results of all other assays peaked at the second measurement (43 days after the positive CMV PCR test). C, Kinetics of CMV-induced IFN- γ responses in 2 CMV-seropositive patients (#3 and #5 in [Supplementary Material 2](#)) who had asymptomatic PCR-confirmed CMV reactivation. Golden and red triangles indicate positive CMV blood PCR results below the quantifiable threshold (<300 copies/mL) and quantifiable results, respectively. The red number symbol (#) highlights negative IFN- γ assay results. Abbreviations: BC, not evaluable due to low CD4 cell numbers acquired and elevated unspecific background; CMV, cytomegalovirus; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; ELISPOT, enzyme-linked immunospot; IFN, interferon; P, T-cell assay not evaluable due to insufficient response to the positive control; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PCR, polymerase chain reaction; ROC AUC, area under the curve of receiver operating characteristics analysis; WB, whole blood.

- of mould exposure in residential and working environment. *Mycoses* **2017**; 60:668–75.
21. Page L, Weis P, Müller T, et al. Evaluation of *Aspergillus* and Mucorales specific T-cells and peripheral blood mononuclear cell cytokine signatures as biomarkers of environmental mold exposure. *Int J Med Microbiol* **2018**; 308:1018–26.
 22. Abate D, Saldan A, Mengoli C, et al. Comparison of cytomegalovirus (CMV) enzyme-linked immunosorbent spot and CMV quantiferon gamma interferon-releasing assays in assessing risk of CMV infection in kidney transplant recipients. *J Clin Microbiol* **2013**; 51:2501–7.
 23. Banas B, Böger CA, Lückhoff G, et al. Validation of T-Track® CMV to assess the functionality of cytomegalovirus-reactive cell-mediated immunity in hemodialysis patients. *BMC Immunology* **2017**; 18:15.
 24. Lophius Biosciences. T-track CMV instructions for use. Available at: https://www.lophius.com/fileadmin/user_upload/Downloads/IFUs/IFU_UREA_CMV_LI-P90003-EN-10-20191213.pdf. Accessed 26 August 2020.
 25. Duechting A, Przybyla A, Kuerten S, Lehmann PV. Delayed activation kinetics of Th2- and Th17 cells compared to Th1 cells. *Cells* **2017**; 6:29.
 26. Rogers R, Saharia K, Chandorkar A, et al. Clinical experience with a novel assay measuring cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity by flow cytometry and intracellular cytokine staining to predict clinically significant CMV events. *BMC Infect Dis* **2020**; 20:58.
 27. Sester M, Sester U, Gärtner B, et al. Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* **2001**; 71:1287–94.

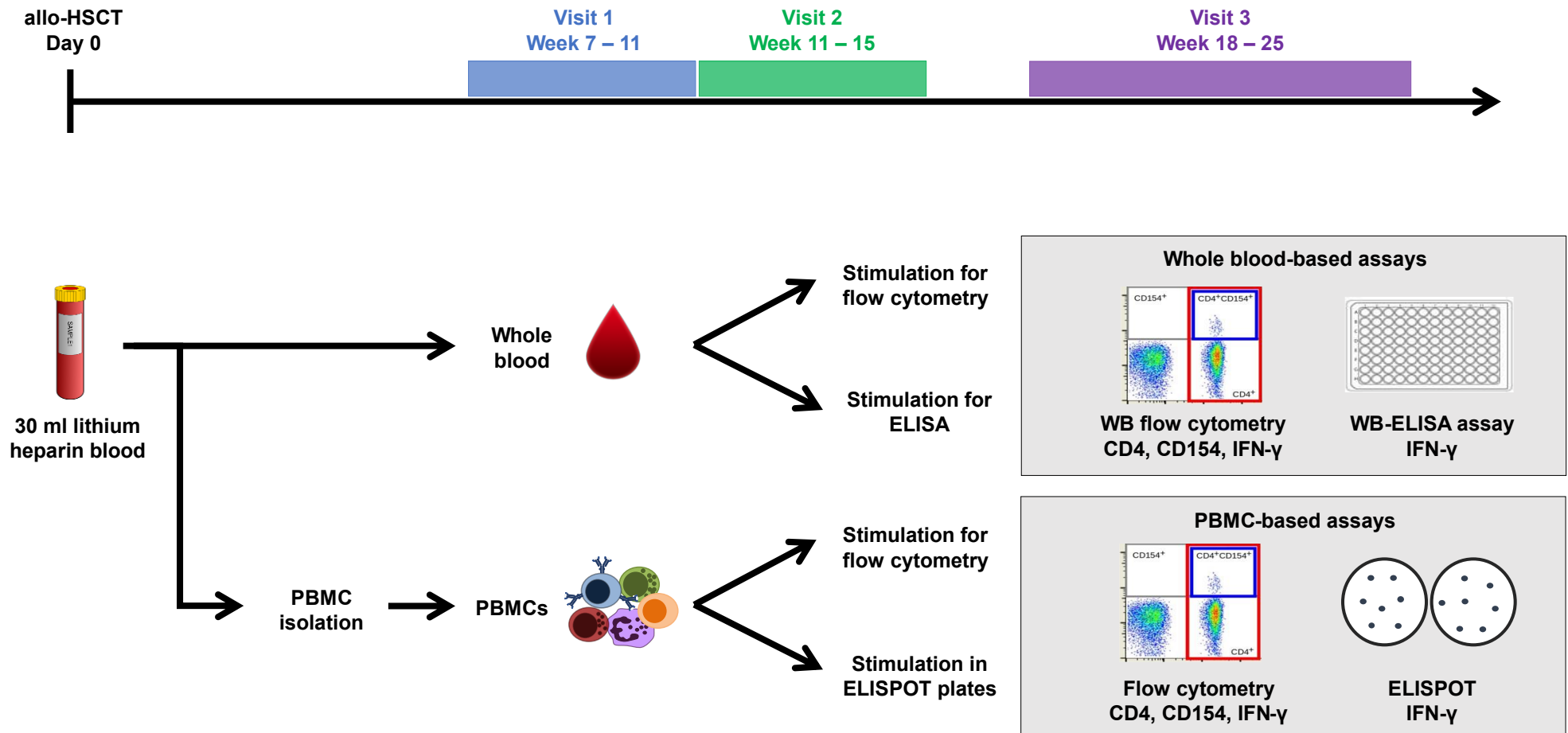
3.4.1 Supplement

T-Cell Immune Surveillance in Allogenic Stem Cell Transplant Recipients: Are Whole Blood-Based Assays Ready to Challenge ELISPOT?

Lauruschkat CD*, Page L*, Etter S, Weis P, Gamon F, Kraus S, Einsele H., Wurster S#, Loeffler J#.

* geteilte Erstautorenschaft, # geteilte Letztautorenschaft

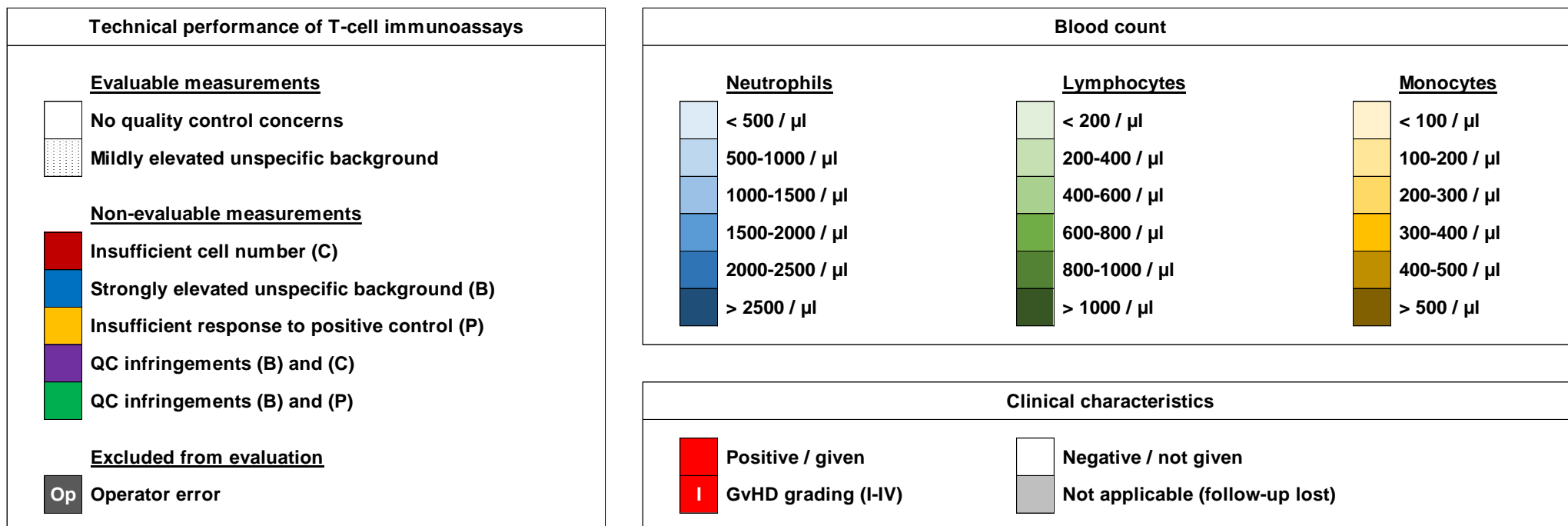
Suppl. Material 1: Study design.



Suppl. Material 2: Summary of patient characteristics and technical assay performance.

	Patient number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Transplant data	Underlying disease	CMMoL	PMF	MPN	MDS	AML	MM	AML	CML/sAML	MPN	AML	AML	AML	MCL	
	Type of transplant	MUD	MMUD	MUD	MMUD	MUD	MRD	MMUD	MMUD	MUD	MUD	MRD	MMUD	MUD	
	CMV status donor	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	
	CMV status recipient	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	
Blood collection	Days post transplantation	71 96 126	72 99 127	64 97 162	48 76 155	48 90 142	64 90 133	71 99 159	69	48 90 132	69	67 81 158	77 105 166	63 93 174	
Acute GvHD within 14 days of blood collection	Skin		I										I	II	
	Gastro-intestinal		III												
	Liver			I											
Systemic immunosuppressive therapy	Cyclosporine A														
	Sirolimus														
	MMF														
	Prednisolone														
Antifungal prophylaxis (not considering PCP prophylaxis)	Fluconazole														
	Posaconazole														
	Voriconazole														
	Caspofungin														
CMV prophylaxis and therapy	Letermovir														
	Valganciclovir														
Evidence of opportunistic infection	Positive CMV PCR														
	Radiological suspicion of IMI														
	Mold-positive cultures														
	Positive <i>Aspergillus</i> biomarkers (GM, BG, PCR)														
Blood count	Neutrophils														
	Lymphocytes														
	Monocytes														
PBMC isolation	PBMC yield (mio. cells from approx. 25 ml blood)	4 4 5	13 27 27	59 7 18	18 16 47	34 37 36	14 56 46	17 53 48	31	53 40 21	11	15 29 6	23 35 13	17 26 17	
Evaluation of T-cell assay performance	Flow cytometry PBMC CD154 AfuLy														
	Flow cytometry PBMC CD154 pp65														
	Flow cytometry WB CD154 AfuLy														
	Flow cytometry WB CD154 pp65														
	Flow cytometry PBMC CD154 IFN-γ AfuLy														
	Flow cytometry PBMC CD154 IFN-γ pp65														
	Flow cytometry WB CD154 IFN-γ AfuLy														
	Flow cytometry WB CD154 IFN-γ pp65														
	ELISPOT IFN-γ AfuLy													Op	
	ELISPOT IFN-γ pp65													Op	
	WB-ELISA IFN-γ AfuLy														
	WB-ELISA IFN-γ pp65														

Legend for Suppl. Material 2: Summary of patient characteristics and technical assay performance.



Footnotes: # Positive CMV PCR blood test 15 days prior to measurement, ∇ positive CMV PCR blood test below the quantifiable threshold in week 2 post-transplantation, © positive CMV PCR blood test(s) at the time of the last T-cell measurement and/or between the last measurement and week 25. Details are provided in **Figures 2B** and **2C**.

Abbreviations of the table can be found on the next page.

Abbreviations: AfuLy = *Aspergillus fumigatus* mycelial lysate, (s)AML = (secondary) acute myeloid leukemia, BG = beta-glucan, CD = cluster of differentiation, CML = chronic myeloid leukemia, CMMoL = chronic myelomonocytic leukemia, CMV = cytomegalovirus, ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay, ELISPOT = enzyme-linked immunospot, GM = galactomannan, GvHD = graft-versus-host disease, IFN- γ = interferon-gamma, IMI = invasive mold infection, MCL = mantle cell lymphoma, MDS = myelodysplastic syndrome, MM = multiple myeloma, MMF = mycophenolate mofetil, MMUD = mismatched unrelated donor, MPN = myeloproliferative neoplasm, MRD = matched related donor, MUD = matched unrelated donor, PBMC = peripheral blood mononuclear cells, PCP = *Pneumocystis* pneumonia, PCR = polymerase chain reaction, PMF = primary myelofibrosis, pp65 = phosphoprotein 65, QC = quality control, WB = whole blood.

Suppl. Material 3: MIATA reporting modules for flow cytometry according to <http://miataproject.org>.

Module 1: Sample		
1.1	Essential donor info	Patients after allogenic stem cell transplantation aged 35 to 69, 8 male, 5 female. Patient characteristics are summarized in Suppl. Material 2 .
1.2	Source of cell material	Venous whole blood
1.3	Collection methodology	Monovette® blood collection system + butterfly needle
1.4	Anti-coagulant	Lithium-heparin
1.5	Transportation / storage conditions for unprocessed samples	Venipuncture was performed at the ward and samples were stored at room temperature while they were transported to the laboratory.
1.6	Cell processing methodology	PBMC isolation using Leucosep™ tubes and ficoll (1.077 g/ml).
1.7	Median time and ranges from sample collection until end of cell processing	Time from blood collection until plating of isolated PBMCs ranged from 124 to 271 min (Median: 170 min). Time from blood draw to begin of whole blood incubation ranged from 39 to 182 min (Median: 60 min).
1.8	Cut-offs	Periods from blood draw to completion of plating of the PBMCs or injection of the whole blood into the whole blood stimulation tubes must not exceed 6 hours.
1.9	Fresh or cryopreserved	Fresh
	1.10 – 1.14 not applicable (no cryopreservation)	
1.15	Median cell yield and viability	Median yield of PBMC isolation: 2.3×10^7 PBMCs from approximately 25 ml lithium heparin whole blood, median viability 96.5% (determined by trypan blue exclusion using Vi-Cell XR (Beckman Coulter).
	1.16 – 1.18 not applicable (no cryopreservation)	
1.19	Cut-offs	Viability after PBMC isolation > 90%.
1.20	Cell counting methodology	PBMCs were counted using Vi-Cell XR (Beckman Coulter)
1.21	Additional assessments	n/a

Suppl. Material 3 (continued)

Module 2: Assay		
2.1	Medium and serum details	RPMI 1640 + GlutaMAX™ (Gibco) + 5% autologous heat-inactivated, sterile-filtered serum was used for PBMC culture and stimulation. No serum was added to whole blood cultures.
2.2	Pre-testing information	As sterile-filtered autologous serum was used, pre-testing was not required.
2.3	Treatment procedures of cells prior to assay	PBMC and whole blood-based flow cytometry were performed as described before [1]. <i>Aspergillus fumigatus</i> mycelial lysate (prepared as described in [2], 50 µg/ml) or CMV pp65 (Lophius Biosciences, 3 µg/ml) were used as antigenic stimuli.
2.4	Sufficient assay details	
2.5	Internal assay controls	Mock-stimulation with 1 µg/ml α-CD28 (PBMCs) or 1 µg/ml α-CD28 + α-CD49d (whole blood) was used as an unspecific background control and reactive T-cell frequencies were deduced from all specific measurements. Phytohemagglutinin (10 µg/ml, Sigma-Aldrich) was used as a positive control.
2.6	Acceptance criteria	Acceptance criteria are summarized in Suppl. Material 8A .
2.7	External reference samples	n/a
2.8	Assay acceptance criteria	n/a

Suppl. Material 3 (continued)

Module 3: Data acquisition																																																																										
3.1	Equipment and software	FACS Calibur & Cell Quest Pro software (BD)																																																																								
3.2	Basic equipment settings	<p>Acquisition: Accept all events, acquisition will stop when 100,000 in G1=R1 (lymphocyte gate according to FSC/SSC properties), resolution: 1024.</p> <p>Channels: P1: FSC-Height, P2: SSC-Height, P3: CD4-FITC, P4: IFN-γ-PE, P7: CD154-APC.</p> <p>Detector / Amplitudes <u>PBMCs</u>: P1 FSC E00 1.30 Lin, P2 SSC 471 1.00 Lin, P3 FL1 705 Log, P4 FL2 613 Log, P5 FL3 690 Log, P7 FL4 879 Log.</p> <p>Detector / Amplitudes <u>Whole Blood</u>: P1 FSC E00 1.30 Lin, P2 SSC 476 1.00 Lin, P3 FL1 705 Log, P4 FL2 613 Log, P5 FL3 690 Log, P7 FL4 850 Log.</p>																																																																								
3.3	Detailed gating strategy	The gating strategy and representative data sets are shown in Suppl. Material 6 .																																																																								
3.4	Representative data set																																																																									
3.5	Mean, median, ranges of event counts for relevant populations	<p>Pooled event counts for unstimulated samples and samples stimulated with AfuLy and pp65 are provided:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th><u>PBMCs</u></th> <th>Visit 1</th> <th>Visit 2</th> <th>Visit 3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Lymphocyte count mean:</td> <td>28515</td> <td>26046</td> <td>33598</td> </tr> <tr> <td>Lymphocyte count median:</td> <td>21434</td> <td>21640</td> <td>29270</td> </tr> <tr> <td>Lymphocyte count min:</td> <td>3639</td> <td>7031</td> <td>4244</td> </tr> <tr> <td>Lymphocyte count max:</td> <td>91256</td> <td>79729</td> <td>85950</td> </tr> <tr> <td>CD4⁺ cells count mean:</td> <td>3961</td> <td>3918</td> <td>6673</td> </tr> <tr> <td>CD4⁺ cells count median:</td> <td>2257</td> <td>2853</td> <td>4999</td> </tr> <tr> <td>CD4⁺ cells count min:</td> <td>95</td> <td>419</td> <td>245</td> </tr> <tr> <td>CD4⁺ cells count max:</td> <td>15705</td> <td>18563</td> <td>25362</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th><u>Whole Blood</u></th> <th>Visit 1</th> <th>Visit 2</th> <th>Visit 3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Lymphocyte count mean:</td> <td>40781</td> <td>40009</td> <td>49022</td> </tr> <tr> <td>Lymphocyte count median:</td> <td>33017</td> <td>34550</td> <td>36570</td> </tr> <tr> <td>Lymphocyte count min:</td> <td>9420</td> <td>12475</td> <td>6350</td> </tr> <tr> <td>Lymphocyte count max:</td> <td>102851</td> <td>99509</td> <td>122386</td> </tr> <tr> <td>CD4⁺ cells count mean:</td> <td>4419</td> <td>6095</td> <td>7578</td> </tr> <tr> <td>CD4⁺ cells count median:</td> <td>2814</td> <td>4456</td> <td>6173</td> </tr> <tr> <td>CD4⁺ cells count min:</td> <td>210</td> <td>728</td> <td>205</td> </tr> <tr> <td>CD4⁺ cells count max:</td> <td>18704</td> <td>18613</td> <td>26910</td> </tr> </tbody> </table>	<u>PBMCs</u>	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Lymphocyte count mean:	28515	26046	33598	Lymphocyte count median:	21434	21640	29270	Lymphocyte count min:	3639	7031	4244	Lymphocyte count max:	91256	79729	85950	CD4 ⁺ cells count mean:	3961	3918	6673	CD4 ⁺ cells count median:	2257	2853	4999	CD4 ⁺ cells count min:	95	419	245	CD4 ⁺ cells count max:	15705	18563	25362	<u>Whole Blood</u>	Visit 1	Visit 2	Visit 3	Lymphocyte count mean:	40781	40009	49022	Lymphocyte count median:	33017	34550	36570	Lymphocyte count min:	9420	12475	6350	Lymphocyte count max:	102851	99509	122386	CD4 ⁺ cells count mean:	4419	6095	7578	CD4 ⁺ cells count median:	2814	4456	6173	CD4 ⁺ cells count min:	210	728	205	CD4 ⁺ cells count max:	18704	18613	26910
<u>PBMCs</u>	Visit 1	Visit 2	Visit 3																																																																							
Lymphocyte count mean:	28515	26046	33598																																																																							
Lymphocyte count median:	21434	21640	29270																																																																							
Lymphocyte count min:	3639	7031	4244																																																																							
Lymphocyte count max:	91256	79729	85950																																																																							
CD4 ⁺ cells count mean:	3961	3918	6673																																																																							
CD4 ⁺ cells count median:	2257	2853	4999																																																																							
CD4 ⁺ cells count min:	95	419	245																																																																							
CD4 ⁺ cells count max:	15705	18563	25362																																																																							
<u>Whole Blood</u>	Visit 1	Visit 2	Visit 3																																																																							
Lymphocyte count mean:	40781	40009	49022																																																																							
Lymphocyte count median:	33017	34550	36570																																																																							
Lymphocyte count min:	9420	12475	6350																																																																							
Lymphocyte count max:	102851	99509	122386																																																																							
CD4 ⁺ cells count mean:	4419	6095	7578																																																																							
CD4 ⁺ cells count median:	2814	4456	6173																																																																							
CD4 ⁺ cells count min:	210	728	205																																																																							
CD4 ⁺ cells count max:	18704	18613	26910																																																																							
3.6	Unusual strategies explained	n/a																																																																								
3.7	Review of raw data	Raw data and gating were reviewed by at least two authors.																																																																								

Suppl. Material 3 (continued)

Module 4: Results		
4.1	Background and ag-specific reactivity levels	Background and antigen specific responses are summarized in Suppl. Material 10 .
4.2	Cut-off specifications	Cut-off specifications are summarized in Suppl. Material 8A .
4.3	Accessibility of raw data	Case report forms and flow cytometry files are stored onsite and were carefully reviewed by at least two authors.
4.4	Definition of positive reactivity (above background) including tests applied	As <i>Aspergillus</i> -reactive T-cells are detectable in most individuals and no cases of invasive aspergillosis were reported, no cut-offs for reactivity were applied. Positive reactivity for CMV was determined retrospectively using ROC curves based on the subjects' CMV serostatus. Cutoffs are provided in Suppl. Material 8A .
4.5	Parameters, software and version used for response determination	Values were quantified using FlowJo v10.6.1.
4.6	Response definition predefined or post-hoc	Post-hoc
4.7	Definition of response induced by treatment	n/a
4.8	Any data excluded and why	No data was excluded.
4.9	Why test was used	Mold- and CMV-reactive T-cells were proposed as a diagnostic biomarker. This study aimed to evaluate and compare the feasibility of different T-cell assays in patients after allogenic stem cell transplantation.
Module 5: Laboratory		
5.1	Guidance of lab operations	Experiments were conducted under GLP principles. SOPs are based on published protocols [1, 3-5]. All lab members were trained thoroughly. Process related parameters were documented in case report forms.
5.2	Laboratory accreditations and certifications	n/a
5.3	Details on audits	n/a
5.4	Status of protocols	Monocentric study with SOPs followed by all authors.
5.5	Status of assays	The study was performed using qualified assays. Comparative assessment of different stimulation schemes was performed and published [1].
5.6	Specific performance criteria	Performance criteria are specified in the Results section of this manuscript and Suppl. Material 8A .

Suppl. Material 4: MIATA reporting modules for ELISPOT according to <http://miataprotect.org>.

Module 1: Sample		
1.7	Median time and ranges from sample collection until end of cell processing	Time from blood collection until seeding of isolated PBMCs into ELISPOT plates ranged from 128 to 275 min (Median: 158 min).
	All other items for Module 1 are identical to those in Suppl. Material 3 or not applicable.	
Module 2: Assay		
2.1	Medium and serum details	CTL Test™ (CTL Europe) was used.
2.2	Pre-testing information	The medium does not contain serum and was tested by the manufacturer.
2.3	Treatment procedures of cells prior to assay	IFN- γ ELISPOT was performed as described before [3], except CTL Test™ (CTL Europe) was used instead of AIM-VALbuMAX (Thermo Fisher Scientific). <i>Aspergillus fumigatus</i> mycelial lysate (prepared as described in [2], 50 μ g/ml) or CMV pp65 (Lophius Biosciences, 3 μ g/ml) were used as antigenic stimuli.
2.4	Sufficient assay details	
2.5	Internal assay controls	Phytohemagglutinin (10 μ g/ml, Sigma-Aldrich) was used as positive control. Background controls consisted of PBMCs, medium, and co-stimulatory factors, but no stimulus. Medium without PBMCs was used as an additional technical control.
2.6	Acceptance criteria	Acceptance criteria are summarized in Suppl. Material 8A .
2.7	External reference samples	n/a
2.8	Assay acceptance criteria	n/a
Module 3: Data acquisition		
3.1	Equipment and software	Plates were analysed with a Bioreader 5000a (BioSYS) using the Bioreader 12.1 software.
3.2	Basic equipment settings	The white balance was set to red: 582, blue: 531. HUE: 180. The diameter of the spots was accepted between 54 and 1000. The brightness was set to 80%, the contrast to 34%, and the sensitivity to 81%.
3.3	Strategy for establishing spot detection parameters	Spot detection settings were chosen to detect clearly visible spots and was optimized as part of a previously published study [3].
3.4	Representative data set	A representative data set is provided in Suppl. Material 7 .
	All other items for Module 3 are identical to those in Suppl. Material 3 or not applicable.	

Suppl. Material 4 (continued)

Module 4: Results		
4.5	Parameters, software and version used for response determination	Analysis was performed using Bioreader 12.1 software.
4.8	Any data excluded and why	One data set (Patient #12, Visit 1) was excluded due to an operator error.
	All other items for Module 4 are identical to those in Suppl. Material 3 or not applicable.	
Module 5: Laboratory		
	All items for Module 5 are identical to those in Suppl. Material 3 .	

Suppl. Material 5: Reporting modules for whole blood ELISA analogous to MIATA criteria.

Module 1: Sample		
	All items for Module 1 are identical to those in Suppl. Material 3 .	
Module 2: Assay		
2.1	Medium and serum details	This assay is whole blood-based. The stimulation cocktail in the test tubes contained 500 µl serum-free CTLTest™ medium (CTL Europe).
2.2	Pre-testing information	No serum supplementation was used.
2.3	Treatment procedures of cells prior to assay	n/a
2.4	Sufficient assay details	<p>Anticoagulant-free blood collection tubes (Sarstedt) were prepared with 500 µl CTLTest™ medium (CTL Europe) supplemented with 1 µg/ml α-CD28 and α-CD49d (Miltenyi Biotec). <i>Aspergillus fumigatus</i> mycelial lysate (prepared as described in [2], 100 µg/ml*) or CMV pp65 (Lophius Biosciences, 6 µg/ml*) were used as antigenic stimuli. The unstimulated background control contained co-stimulatory factors and medium, but no antigen. The positive control consisted of medium and phytohemagglutinin (20 µg/ml*, Sigma-Aldrich). Stimulation tubes were cryopreserved at -20 °C for up to four weeks.</p> <p>Within 30 min of blood collection, stimulation tubes were brought to room temperature. 500 µl whole blood was added to each stimulation tube using a graduated 1 ml insulin syringe. Stimulation tubes were inverted 10 times and incubated for 24 h at 37 °C. Plasma was collected, centrifuged at 2000 g for 20 min, and cryopreserved at -20 °C. Cytokine concentrations were measured using the IFN-γ ELISA Max Deluxe Set (Biolegend) according to the manufacturer's manual.</p>
2.5	Internal assay controls	Phytohemagglutinin (10 µg/ml final concentration, Sigma-Aldrich) was used as positive control for each sample. Background controls consisted of whole blood, medium, and co-stimulatory antibodies, but no stimulus.
2.6	Acceptance criteria	Acceptance criteria are summarized in Suppl. Material 8A .
2.7	External reference samples	n/a
2.8	Assay acceptance criteria	n/a

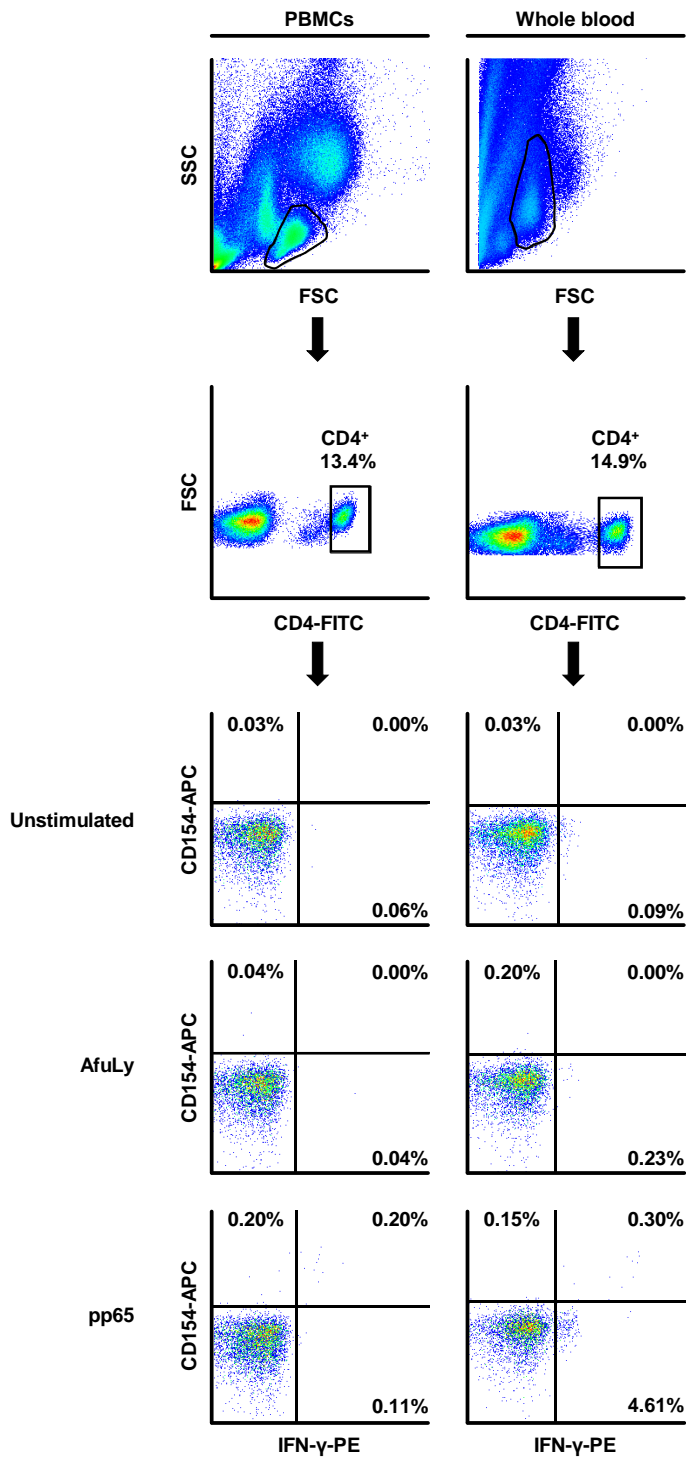
* These concentrations refer to the stimulation mix in the ready-to-use whole blood stimulation tubes. After injection of 500 µl whole blood, final-concentrations are 50 µg/ml *Aspergillus fumigatus* mycelial lysate, 3 µg/ml CMV pp65 and 10 µg/ml phytohemagglutinin, respectively.

Suppl. Material 5 (continued)

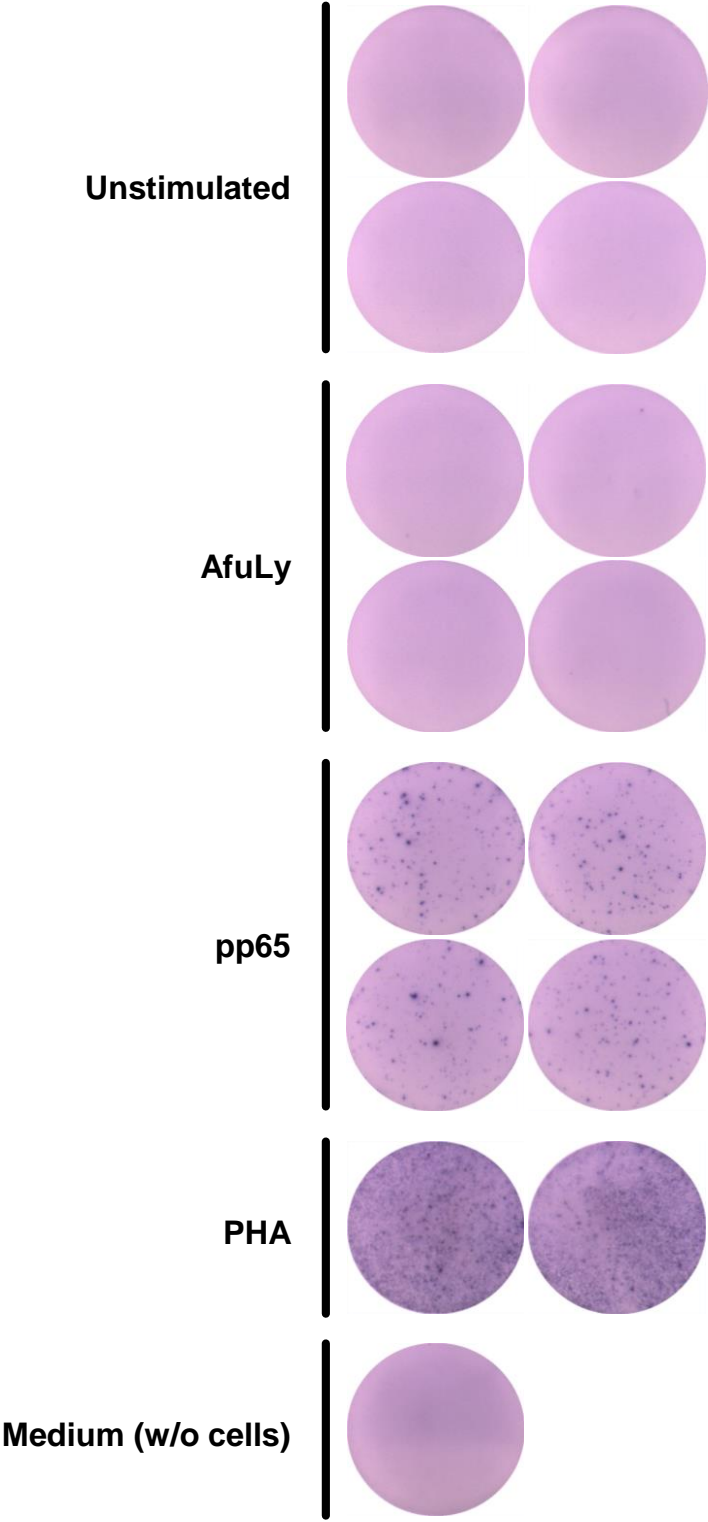
Module 3: Data acquisition		
3.1	Equipment and software	Plates were analysed with a Tecan NanoQuant infinite M200 Pro using Tecan I-control 1.12.
3.2	Basic equipment settings	Absorbance was set to 450 nm and the reference wave length to 570 nm. 25 flashes were used. The shaking duration was set to 5 sec with an amplitude of 3.5 and linear mode. Plate setting NUN96ft – Thermo Fisher Scientific 96 Flat Transparent was applied.
	All other items for Module 3 are identical to those in Suppl. Material 3 or not applicable.	
Module 4: Results		
4.5	Parameters, software and version used for response determination	Analysis was performed using Microsoft Excel 365.
4.8	Any data excluded and why	No data was excluded.
	All other items for Module 4 are identical to those in Suppl. Material 3 or not applicable.	
Module 5: Laboratory		
	All items for Module 5 are identical to those in Suppl. Material 3 .	

Suppl. Material 6: Gating strategy and representative data set for flow cytometry.

(CMV-seropositive patient).



Suppl. Material 7: Representative data set for ELISPOT (CMV-seropositive patient).



Suppl. Material 8: Performance criteria for investigational (A) and commercial (B) T-cell assays.

A

Modality	Flow cytometry		ELISPOT	ELISA
Readout	% CD154 ⁺ /CD4 ⁺	% CD154 ⁺ IFN- γ ⁺ /CD4 ⁺	IFN- γ SFCs per 10 ⁶ PBMCs	IFN- γ pg/ml
Matrix	Both	Both	PBMCs	WB
Cutoff cell number	5000 acquired lymphocytes and 2000 CD4 cells (per stimulus)		◇	n/a
Cutoff for minimum PHA response	0.30%	0.15%	100	20
Cutoff unspecific background	0.14%	0.07%	50	10
Mildly elevated background	0.07%	0.05%	25	5
Retrospectively determined cutoff for test positivity	0.061%	0.066%	36	17.6

◇: no specific cutoff was applied; however, in one instance, PBMC yield was insufficient to fill all required wells

n/a: not applicable to the modality

Suppl. Material 8 (continued)

B

Modality	ELISPOT		ELISA
Readout	IFN- γ SFCs per 10^6 PBMCs *		IFN- γ concentration
Kit	T-Track CMV	T-Spot CMV	QuantiFERON CMV
Manufacturer	Lophius Biosciences	Oxford Immunotec	Qiagen
Matrix	PBMCs	PBMCs	WB
Cutoff cell number	#	#	n/a
Cutoff mitogen response	50 \circ	80	0.5 IU/ml = 25 μ g/ml \circ
Cutoff unspecific background	50 Δ	40	0.2 IU/ml = 10 μ g/ml Δ
Definition of positive result	50 after subtracting background	No specific cutoff	0.2 IU/ml = 10 μ g/ml after subtracting background

* all values in the manufacturer's protocol were converted to a denominator of 10^6 PBMCs

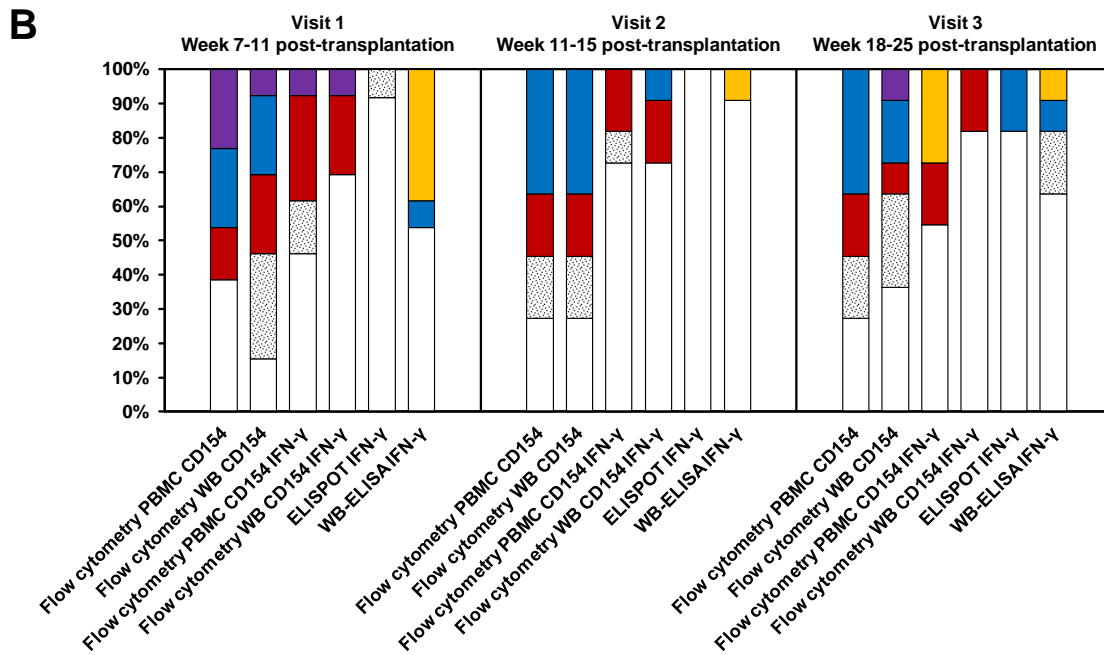
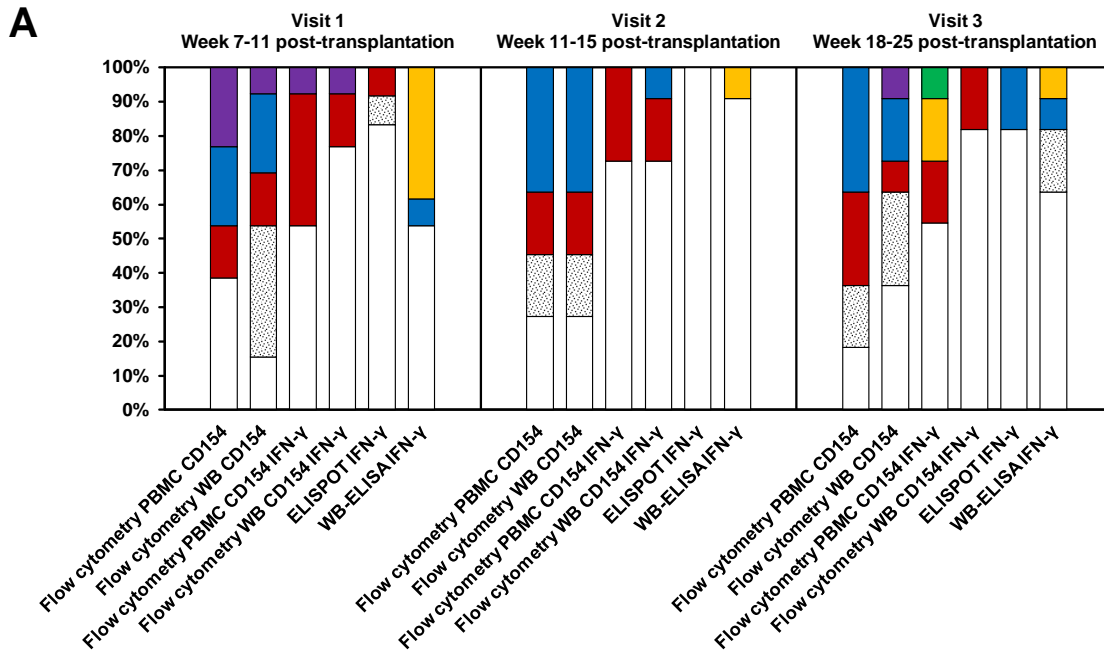
no specific requirement as long as all required wells and controls can be tested

\circ requirement only applies to measurements that are non-reactive to the CMV antigen stimulus

Δ no requirement, value provided in the table represents a recommendation

Suppl. Material 9: Performance of T-cell assays depending on the sampling time point and modality.

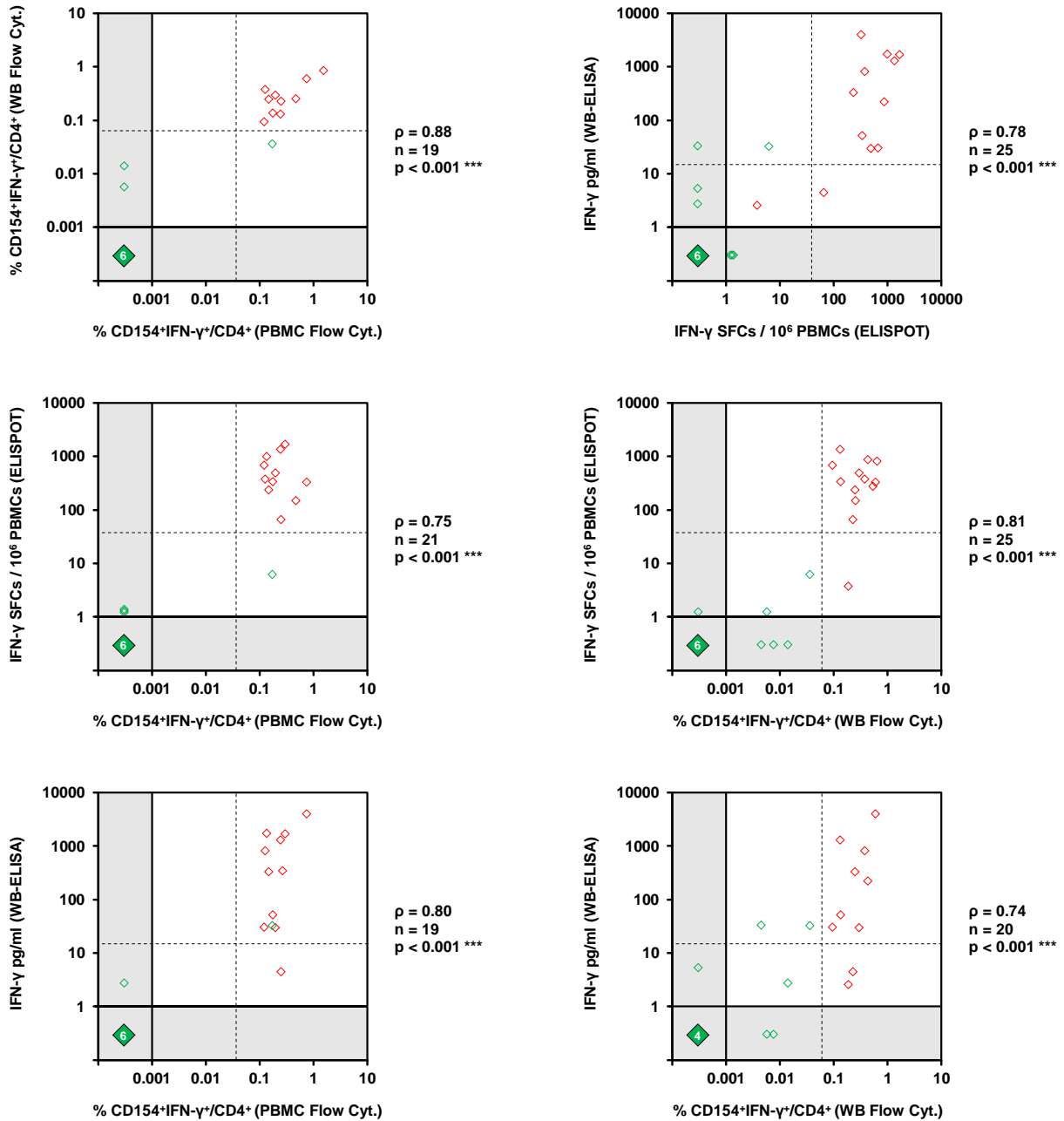
Stimulus: A = *Aspergillus fumigatus* mycelial lysate, B = CMV pp65



Suppl. Material 10: Distributions of *A. fumigatus*-induced T-cell responses and unspecific background.

Modality	Flow cytometry				ELISPOT	ELISA
	% CD154 ⁺ /CD4 ⁺		% CD154 ⁺ IFN- γ ⁺ /CD4 ⁺		IFN- γ SFCs per 10 ⁶ PBMCs	IFN- γ pg/ml
Matrix	PBMCs	WB	PBMCs	WB	PBMCs	WB
<i>A. fumigatus</i>-reactive T-cell response (after subtraction of unspecific background)						
1st quartile	0.035%	0.167%	0.000%	0.017%	0.00	0.67
Median	0.069%	0.238%	0.016%	0.038%	0.75	3.35
3rd quartile	0.141%	0.496%	0.032%	0.120%	2.00	9.60
Unspecific background						
1st quartile	0.015%	0.047%	0.000%	0.000%	0.00	0.00
Median	0.033%	0.086%	0.000%	0.000%	1.88	0.00
3rd quartile	0.081%	0.115%	0.000%	0.021%	3.75	0.37

Suppl. Material 11: Correlation of CMV pp65-induced IFN- γ responses across the studied protocols.



Green = CMV seronegative, red = seropositive or CMV infection, dashed lines = retrospectively determined cutoff for positive result, ρ = Spearman's rank correlation coefficient, n = number of measurements evaluable for both protocols compared in each graph, p = p-value of Spearman coefficient.

Suppl. Material 12: Concordance of test results across IFN- γ -based CMV pp65 immunoassays.

Readout 1	PBMC Flow Cytometry (% CD154⁺IFN-γ⁺/CD154⁺)		
Readout 2	WB Flow Cytometry (% CD154⁺IFN-γ⁺/CD4⁺)	ELISPOT (SFCs/10⁶ PBMCs)	WB-ELISA (pg/ml)
# of measurements evaluable for both assays	19	21	19
Positive in both assays	10 (53%)	11 (52%)	11 (58%)
Negative in both assays	8 (42%)	9 (43%)	7 (37%)
Overall concordance	18 (95%)	20 (95%)	18 (95%)
Positive for readout 1 Negative for readout 2	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)
Negative for readout 1 Positive for readout 2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Readout 1	WB Flow Cytometry (% CD154⁺IFN-γ⁺/CD4⁺)		ELISPOT (SFCs/10⁶ PBMCs)
Readout 2	ELISPOT (SFCs/10⁶ PBMCs)	WB-ELISA (pg/ml)	WB-ELISA (pg/ml)
# of measurements evaluable for both assays	25	20	25
Positive in both assays	12 (48%)	8 (40%)	10 (40%)
Negative in both assays	12 (48%)	8 (40%)	12 (48%)
Overall concordance	24 (96%)	16 (80%)	22 (88%)
Positive for readout 1 Negative for readout 2	1 (4%)	2 (10%)	1 (4%)
Negative for readout 1 Positive for readout 2	0 (0%)	2 (10%)	2 (8%)

Supplementary References

1. Weis, P.; Helm, J.; Page, L.; et al. Development and evaluation of a whole blood-based approach for flow cytometric quantification of CD154+ mould-reactive T cells. *Med Mycol* **2020**, *58*, 187-196, doi:10.1093/mmy/myz038.
2. Bacher, P.; Hohnstein, T.; Beerbaum, E.; et al. Human Anti-fungal Th17 Immunity and Pathology Rely on Cross-Reactivity against *Candida albicans*. *Cell* **2019**, *176*, 1340-1355.e1315, doi:10.1016/j.cell.2019.01.041.
3. Lauruschkat, C.D.; Wurster, S.; Page, L.; et al. Susceptibility of *A. fumigatus*-specific T-cell assays to pre-analytic blood storage and PBMC cryopreservation greatly depends on readout platform and analytes. *Mycoses* **2018**, *61*, 549-560, doi:10.1111/myc.12780.
4. Wurster, S.; Weis, P.; Page, L.; et al. Intra- and inter-individual variability of *Aspergillus fumigatus* reactive T-cell frequencies in healthy volunteers in dependency of mould exposure in residential and working environment. *Mycoses* **2017**, *60*, 668-675, doi:10.1111/myc.12643.
5. Wurster, S.; Weis, P.; Page, L.; et al. Quantification of *A. fumigatus*-specific CD154+ T-cells-preanalytic considerations. *Med Mycol* **2017**, *55*, 223-227, doi:10.1093/mmy/myw054.

4 Diskussion

4.1 Wissensstand vor den Erkenntnissen der Dissertation

Die Vielzahl der zur Diagnosestellung zu berücksichtigenden Kriterien wie Patientenhistorie, Grunderkrankung, Patientenimmunstatus, typische Symptome sowie die Unzuverlässigkeit und Schwächen der einzelnen aktuellen diagnostischen *A. fumigatus*-Tests führen zu späten oder falschen Diagnosen, die durch eine verzögerte oder inkorrekte Therapie zu einer erhöhten Mortalität und verstärkten Symptomatik führen (ausführlich beschrieben in **Kapitel 1.2**). Daher besteht eine unbedingte Notwendigkeit für neue diagnostische Tests im diversen Spektrum der *A. fumigatus*-assoziierten Krankheitsbilder. Ein innovatives Diagnostikum, das in verschiedenen *A. fumigatus*-assoziierten Krankheitsbildern erfolgreich eingesetzt werden kann, würde die Versorgung einer großen Anzahl von Patienten verbessern. Studien haben gezeigt, dass die Th-Zell-Antwort eine wichtige Rolle in vielen der *Aspergillus*-assoziierten Erkrankungen einnimmt. Hierbei konnten Differenzen in der Höhe der Th-Zell-Frequenz, der Th-Zytokinsekretion und der Zytokinverhältnisse von Th1-/Th2- und Th17-Zellen zwischen Patienten und Kontrollen in verschiedenen *A. fumigatus*-assoziierten Erkrankungen festgestellt werden (siehe **Kapitel 1.3.4**). Die Stärke und Art der Immunantwort kann in funktionellen T-Zell-Assays quantifiziert werden. T-Zell-Assays werden bereits bei anderen Infektionskrankheiten eingesetzt. Für die Tuberkulose gehören sie bereits zur Routinediagnostik, was die Anwendbarkeit dieser Tests in der Klinik zeigt (siehe **Kapitel 1.4.2**).

T-Zell-Assays werden daher auch für *A. fumigatus*-assoziierte Krankheitsbilder erforscht. In Pilotstudien wurde das Potenzial der Assays aufgezeigt, Patienten mit *A. fumigatus*-assoziierten Erkrankungen von Kontrollpatienten zu diskriminieren. Die Assays wurden jedoch zumeist nur bei Hochrisikopatienten mit hämatologischen Grunderkrankungen evaluiert. Obwohl die Unterscheidung von Patienten und Kontrollpatienten möglich war, gab es eine hohe Anzahl von nicht auswertbaren Tests und eine longitudinale Testung war in vielen Fällen erforderlich, um falsch-negative Testergebnisse zu vermeiden (siehe **Kapitel 1.4.3**). Die Unzuverlässigkeit der Tests in der Gruppe der hämatologischen Patienten kann auf verschiedene Gründe zurückgeführt

werden. Hämatologische Patienten sind aufgrund ihrer Grunderkrankung und deren Behandlung z. B. durch Immunsuppressiva immunkompromittiert [237, 238]. Sie sind daher eine problematische Zielgruppe für einen Test, der die Reaktion des Immunsystems quantifiziert. *A. fumigatus*-assoziierte Hypersensitivitätskrankheiten sind auf Grund des funktionaleren Immunsystems der Patienten eine potenziell sinnvollere Patientenkohorte zur Etablierung und Anwendung von funktionellen T-Zell-Assays. Es gibt jedoch kaum Studien zu deren Einsatz in diesen Kohorten (siehe **Kapitel 1.4.3**).

In der Literatur sind Faktoren bekannt, die Testergebnisse von T-Zell-Assays stark beeinflussen. Diese Faktoren sind unter anderem präanalytische Lagerzeit, insuffiziente Standardisierung von Protokollen und Kryokonservierung. Demzufolge sollten die präklinischen T-Zell-Assays für *A. fumigatus*-assoziierte Krankheitsbilder auf den Einfluss dieser Faktoren hin untersucht werden, um einen möglichst robusten, praktikablen und reproduzierbaren T-Zell-Assay zu entwickeln. Vor dem Hintergrund der natürlichen, ubiquitären Hintergrundexposition und den dadurch resultierenden *A. fumigatus*-spezifischen T-Zell-Frequenzen bei gesunden Individuen, kann es in diesen Tests leicht zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen kommen.

Der in der Literatur am weitesten verbreitete Assay basiert auf der durchflusszytometrischen Detektion von *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen mit Hilfe des Aktivierungsmarkers CD154 (siehe **Kapitel 1.4.3**). Durchflusszytometrische Analysen können jedoch nur an großen medizinischen Zentren und mit Hilfe von fachkundigem Personal durchgeführt werden. Alternative Assayplattformen für die adaptive Immundiagnostik von *A. fumigatus*-assoziierten Krankheitsbilder sind daher notwendig.

Aktuell bestimmen die meisten T-Zell-Assays nicht die Art der Th-Antwort, sondern beschränken sich auf die Analyse von IFN- γ . Die Differenzierung der diversen Th-Antworten ist jedoch von großer Relevanz für die Evaluation von *A. fumigatus*-assoziierten Krankheiten (siehe **Kapitel 1.4.2** und **Kapitel 1.3.4**). Durch den bisherigen Fokus der adaptiven Immundiagnostik auf IFN- γ als Aktivierungsmarker ist der Einfluss von präanalytischen Faktoren auf andere Zytokine oder Aktivierungsmarker weitgehend unbekannt.

4.2 Kriterien für einen klinisch anwendbaren T-Zell-Test für *A. fumigatus*

Für die Entwicklung eines diagnostischen Tests gibt es Kriterien, die über einen sinnvollen Einsatz des Assays in der Routine entscheiden [208, 209, 230, 239-245]. Diese Kriterien umfassen Reproduzierbarkeit der Testergebnisse, Robustheit gegenüber präanalytischen Lagerzeiten und Transport, Einfluss von Kryokonservierung, die Möglichkeit zur CD4-Normalisierung, die Komplexität der Laborausstattung, die Größe des von den Operatoren benötigten Fachwissens sowie Kosten und Aufwand. Diese Kriterien werden im Folgenden diskutiert und sind in **Tabelle 13** zusammengefasst [208, 209, 230, 239-245].

Neben diesen technischen Parametern ist das wichtigste Kriterium für die Entwicklung eines *A. fumigatus*-spezifischen T-Zell-Assays die Differenzierung von Patienten mit *A. fumigatus*-assoziierten Krankheitsbildern und entsprechenden Kontrollgruppen. Dieser Faktor wird daher separat in **Kapitel 4.7** diskutiert und ebenfalls in **Tabelle 13** dargestellt.

Kriterien für einen klinisch anwendbaren <i>A. fumigatus</i> -T-Zell-Test	PBMC-basiert			VB-basiert	
	ELISPOT	ELISA	Durchflusszy.	Durchflusszy.	ELISA
Differenzierung von Patienten mit <i>A. fumigatus</i> -assoziierten Erkrankungen und Kontrollgruppen (siehe Kapitel 4.7)	+	?	+	?	+
Hohe Reproduzierbarkeit der Testergebnisse	+	?	+	+	+
Robustheit gegen präanalytische Lagerzeiten und Transport	< 6 Std.	< 6 Std.	2 Std.	6 Std.	8 Std.
Kryokonservierung	-	-	+	-	+
Batch-Analysen	+	+	-	-	+
CD4-Normalisierung	-	-	+	+	-
Geringe Komplexität der Laborausstattung und geringes benötigtes Fachwissen	+	+	-	-	+
Geringe Kosten und Aufwand	-	-	-	+	+

Tabelle 13: Kriterien für einen klinisch anwendbaren *A. fumigatus* T-Zell-Test und die Erfüllung dieser Kriterien in den verschiedenen Assays. Abkürzungen: CD = *Cluster of Differentiation*, Durchflusszy. = Durchflusszytometrie, Std. = Stunden, PBMC = Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, VB = Vollblut.

4.2.1 Reproduzierbarkeit und Akkuratheit der Testergebnisse

Die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse ist ein entscheidendes Kriterium für einen diagnostischen Test [239-241]. Daten zur Reproduzierbarkeit von T-Zell-Assays sind hauptsächlich vom QFN-Test bekannt. Dem QFN-Test wird eine hohe Reproduzierbarkeit bei dichotomen (positiv/negativ) Ergebnissen bescheinigt. Jedoch schwankt die genaue Höhe der gemessenen IFN- γ -Konzentrationen in aufeinander folgenden QFN-Tests desselben Individuums. Dies kann bei Patienten mit Ergebnissen nahe den Grenzwerten zur variablen Interpretation (negativ zu positiv oder positiv zu negativ) der Testergebnisse führen [239-241].

In experimentellen Schimmelpilz-T-Zell-Assays ist die Analyse der Reproduzierbarkeit bislang kaum untersucht. Auf Grund der Wichtigkeit dieses Parameters für diagnostische Assays lag ein Hauptaugenmerk unserer Arbeit auf der Entwicklung eines reproduzierbaren Tests. Die Reproduzierbarkeit ist besonders für adaptive *A. fumigatus*-T-Zell-Assays von hoher Bedeutung, da das ubiquitäre Vorkommen der Pilzsporen zu einer natürlichen Hintergrund-T-Zell-Frequenz führt (siehe **Kapitel 1.4.3**) [151, 172, 222]. Während bei der Tuberkulose ein dichotomes Ergebnis ausreicht, ist durch die *Aspergillus*-Hintergrundexposition ein präzises quantitatives Ergebnis nötig. Variationskoeffizienten von 25 % für gut definierte Antigene, wie die genutzten Proteinantigene, und 35 % für komplexere Antigene, wie das genutzte Lysat, gelten als akzeptable Abweichungen für adaptive Immunzellassays [235]. Die Ergebnisse des von uns entwickelten VB-ELISAs befanden sich innerhalb dieser Grenzwerte, sowohl für den Variationskoeffizienten zwischen zwei vom selben Operator analysierten Stimulationsröhrchen als auch für von verschiedenen Operatoren durchgeführte Tests vom selben Spender [246]. Basierend auf den bei gesunden Probanden erhobenen Daten erfüllt der Test auch den Variationskoeffizientvorgaben der FDA für Liganden-bindende Assays wie den ELISA [247]. Bei der PBMC-basierten Durchflusszytometrie nach *A. fumigatus*-Lysatstimulation lagen die Variationskoeffizienten ebenfalls unter 35 % [232]. Für den ELISPOT T-SPOT.TB berichteten Tuuminen und Kollegen von einem Variationskoeffizienten von unter 20 % bei Stimulation mit den im *Kit* befindlichen gut definierten Antigenen. In der Studie wurden jedoch nur wenige Proben getestet [248]. Generell ist die Datenlage zur technischen Reproduzierbarkeit des T-SPOT.TB limitiert. Vergleichend

zeigte der ELISPOT in unseren Experimenten [232] bei *A. fumigatus*-Lysatstimulation von direkt nach der Blutentnahme isolierten PBMCs ebenfalls geringere Variationskoeffizienten als die Zielvorgabe von 35 % bei *A. fumigatus*-Lysat-Stimulation für die Zytokine IL-5, IL-13, IL-17 (Daten nicht gezeigt). Der Variationskoeffizient für IFN- γ lag bei sehr geringen Messwerten, die statistisch zu einer unvermeidbar höheren Varianz führen, geringfügig über 35 % (Daten nicht gezeigt). Unsere Daten bei gesunden Spendern, untermauert durch Erfahrungen aus der Literatur, suggerieren, dass der Variationskoeffizient bei niedrigen Messwerten nahe des Detektionslimits höher ausfällt als bei höheren Messwerten [246, 248, 249]. Geringe Konzentrationen nahe den Grenzwerten sollten daher in Zukunft besonders akkurat überprüft werden.

Viele Faktoren, die zu einer größeren Varianz in T-Zell-Assays führen, sind bereits in der Literatur beschrieben. Variabilitätsfaktoren sind unter anderem Wirtsfaktoren wie eine Veränderung des Immunstatus z. B. durch den Einsatz von Immunsuppressiva. Zusätzlich können Unterschiede in der Handhabung der Röhren, wie z. B. Differenzen beim Vermischen des Blutes mit dem Antigen durch das Invertieren der Röhren, zu erhöhter Variabilität beitragen [241]. Starkes Schütteln der QFN-Stimulationsröhren erhöhte z. B. die gemessenen IFN- γ -Ergebnisse [241]. Die Messung des Plasmas im ELISA kann ebenfalls durch andere Faktoren wie Pipettierfehler oder variables Blutvolumen beeinflusst werden [241, 250]. Derartige prozedurale Faktoren sollten in multizentrischen Studien evaluiert und standardisiert werden.

Ein fluktuierendes Blutvolumen in den Stimulationsröhren des QFT-Tests hat einen direkten Einfluss auf die Ergebnisse [241, 250]. Im VB-ELISA haben wir dieses Problem verringert, indem die Röhren mit einer definierten Blutmenge mittels einer graduierten Spritze beimpft werden. Bei den von uns generierten Daten zur Intra-Operator-Varianz (zwei Stimulationsröhren vom selben Labormitarbeiter mit Blut desselben Spenders aus derselben Blutentnahme zum gleichen Zeitpunkt eingespritzt) wurden keine entscheidenden Abweichungen zwischen den beiden eingespritzten Stimulationsröhren festgestellt, was darauf hindeutet, dass mit unserem System eine konstante Blutmenge in die Stimulationsröhren injiziert werden kann [246].

Ein weiterer Variabilitätsfaktor ist eine ungenaue Einhaltung der vorgeschriebenen Inkubationszeiten. Moderate Verlängerungen der Inkubationszeit (z. B. um 8 Std.) beeinflussten die Testergebnisse für IFN- γ im QFN-Test nicht [250]. Jedoch können lange Inkubationszeiten von 2 oder 3 Tagen im selben Test zu falsch-positiven und nicht auswertbaren Ergebnissen führen [251]. Eine Ausweitung des validierten Auswertungszeitraums nach der Stimulation um mehr als 2 Std. (z. B. Plasmaentnahme im VB-ELISA zwischen 24 und 26 Std. nach Start der Inkubation) würde die Praktikabilität und Flexibilität des VB-ELISAs in der Labordurchführung erhöhen. Auf Grund der unsicheren Datenlage zur Suzeptibilität verschiedener Zytokine neben IFN- γ könnten bei einem verlängerten Zeitraum Testergebniskonversionen im VB-ELISA verursacht werden, sodass dahingehend eine detaillierte experimentelle Validierung nötig ist.

Die in diesem Abschnitt genannten Faktoren in Kombination mit der natürlichen Varianz der Ergebnisse haben im QFN-Test einen besonders großen Einfluss auf die Ergebnisse in der Nähe des Grenzwertes. Ergebnisse in diesem Bereich werden in der Literatur als intermediäre Ergebnisse bezeichnet und haben bei serieller Testung ein erhöhtes Risiko einer Ergebniskonversion. Sowohl hohe als auch niedrige Ergebnisse, die entfernt vom Grenzwert liegen, sind bei serieller Testung robust [249, 252]. Das Vorkommen einer intermediären Ergebniszone ist daher auch bei unserem VB-ELISA wahrscheinlich und sollte insbesondere auf Grund der natürlichen Hintergrundexposition bei größeren Patientenkohorten überprüft werden.

4.2.2 Präanalytische Lagerzeiten und Transport

Die präanalytische Lagerzeit und der Transport der Blutproben haben ebenfalls einen großen Einfluss auf die Ergebnisse der funktionellen T-Zell-Assays. Verlängerte präanalytische Lagerzeiten senken die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit von T-Zell-Assays. Die Länge der zulässigen präanalytischen Lagerzeiten ist abhängig vom genutzten Test und muss daher für neue Assays bestimmt werden, damit eine optimale Testleistung gewährleistet werden kann. Gute Testleistungen bei längerer präanalytischer Lagerzeit sind für die Anwendbarkeit eines T-Zell-Tests entscheidend [208, 209, 242, 243].

Das Blut für den T-SPOT.TB sollte innerhalb von 8 Std. und für den QFN-Test innerhalb von 16 Std. verarbeitet werden [242]. Verzögerungen in der Verarbeitung und Inkubation der Assayproben führen zu einer erhöhten Anzahl von falsch-positiven, falsch-negativen und nicht-auswertbaren Ergebnissen [208, 209, 242, 243]. Selbst kurze Verzögerungen in der Verarbeitung und der Inkubation der Proben können zu unzuverlässigen Ergebnissen führen [208, 243]. Doberne und Kollegen berichteten, dass eine Verzögerung der Inkubation von 6 oder 12 Std. im QFN zu 19 bzw. 22 % Ergebniskonversionen führten [208]. Die Verminderung der präanalytischen Lagerzeit führte umgekehrt zu einer geringeren Anzahl nicht-auswertbarer Ergebnisse [209, 253]. In einer südkoreanischen Studie konnte die Anzahl der nicht-auswertbaren Ergebnisse (Nichteinhaltung der Grenzwerte der Positiv- und/oder Negativkontrolle) im QFN-Test durch die Verminderung der präanalytischen Lagerzeit von 10 auf 3 Std. von 11 auf 3 % gesenkt werden [209]. Für den T.Spot.TB wurde ebenfalls festgestellt, dass aus längeren Lagerzeiten schlechtere Testleistungen resultieren [253, 254]. Auch in der Mykologie hat die präanalytische Lagerzeit einen starken Einfluss auf die Immunzellfunktionalität. Wurster und Kollegen beschrieben, dass die PBMC-basierte durchflusszytometrische Detektion von *Aspergillus*-spezifischen Th-Zellen bereits nach 6 Std. präanalytischer Lagerzeit signifikant vermindert war, und empfehlen eine maximale präanalytische Lagerzeit von 2 Std. [222].

Die spezifischen T-Zell-Frequenzen und Zytokinkonzentrationen, die via Durchflusszytometrie, ELISPOT und ELISA (alle PBMC-basiert) nach *A. fumigatus*-Stimulation gemessen wurden, wichen in den von uns durchgeführten Experimenten nach 6 Std. präanalytischer Lagerzeit signifikant von den Ergebnissen mit direkt nach Blutentnahme verarbeiteten Zellen ab. Die meisten Abweichungen wurden durch einen Funktionsverlust der Zellen verursacht. Sowohl in der Durchflusszytometrie als auch im ELISPOT verringerte sich die gemessene *Aspergillus*-spezifische T-Zell-Frequenz. Im ELISPOT verringerte sich die Anzahl der *spot forming cells* (SFCs) um 40 %. In der klinischen Praxis könnten hieraus falsch-negative Testergebnisse resultieren. Im ELISA blieben die gemittelten Zytokinkonzentrationen weitestgehend konstant, doch große intra-individuelle Abweichungen verhinderten einen sinnvollen diagnostischen Einsatz. Zytokine besaßen unterschiedliche Suszeptibilitäten gegenüber präanalytischen Lagerzeiten. Besonders suszeptibel waren IL-2, IL-8, IL-10 und IL-17, die 0.1 bis über 10-fache

Konzentrationsveränderungen im Vergleich von sofort gemessenen PBMCs zu 6 Std. gelagerten PBMCs zeigten. IL-17 reagierte hierbei besonders suszeptibel auf präanalytische Faktoren. Neben den gerade genannten großen intra-individuellen Abweichungen im ELISA hatte eine verlängerte präanalytische Lagerzeit auch im ELISPOT einen starken Einfluss auf die Anzahl der detektierbaren IL-17 SFCs. IL-17 SFCs, die bei sofort isolierten PBMCs noch robust gemessen wurden, konnten nach 6 Std. präanalytischer Lagerzeit in vielen Fällen nur noch in stark verminderter Frequenz detektiert werden [232]. Von einer erhöhten Suszeptibilität von IL-17 wurde ebenfalls von anderen Arbeitsgruppen berichtet [255]. Eine robuste Quantifizierung von IL-17 ist jedoch für die Diagnose von Schimmelpilz-assoziierten Krankheitsbildern von großer Bedeutung, da IL-17 eine wichtige Rolle in den prädisponierenden chronischen Lungenerkrankungen für Schimmelpilz-assoziierte Erkrankungen und in den Schimmelpilz-assoziierten Krankheitsbildern selbst spielt. Hierbei kann IL-17 sowohl *A. fumigatus*-Persistenz als auch *A. fumigatus*-Elimination unterstützen (siehe **Kapitel 1.3.4**) [124, 154, 256]. Daher haben wir für den VB-ELISA präanalytische Lagerzeiten für IFN- γ und IL-17 validiert.

Der VB-ELISA zeigte reproduzierbare Testleistungen bei präanalytischen Lagerzeiten von bis zu 8 Std. und ist damit robuster als die bisher veröffentlichten und von uns getesteten T-Zell-Assays für *A. fumigatus*-spezifische T-Zellen. Die Möglichkeit einer präanalytischen Lagerzeit von 8 Std. ist die Voraussetzung für einen realistischen klinischen Einsatz. Die Stimulationsröhrchen des VB-ELISAs werden direkt nach der Blutentnahme eingespritzt, selbst wenn sie erst später inkubiert werden. Die gegenüber der Literatur verbesserte präanalytische Lagerzeit könnte daher auf die direkte Verdünnung des Blutes mit RPMI, die unverzügliche Stimulation und/oder die Kostimulation zurückzuführen sein.

Ein Hauptgrund für die nachlassende Funktionalität während der präanalytischen Lagerzeit ist die Aktivierung von Granulozyten [257, 258]. Granulozyten-Aktivierung kann die Funktionalität von T-Zellen inhibieren und unspezifische Hintergründe erhöhen [259]. In den Stimulationsröhrchen unseres VB-ELISAs wird das Blut 1:2 mit RPMI verdünnt. Durch das nährstoffreichere Umfeld könnten die Funktionalität und Viabilität der Granulozyten und der

anderen Zelltypen gefördert werden. Ähnliche kommerzielle Systeme wie TruCulture (Myriad RBM, Austin, USA) benutzen ebenfalls eine Blutverdünnung mittels Nährmedium im Stimulationssystem.

Die direkte Aktivierung der Immunzellen durch den in den Stimulationsröhrchen enthaltenen Stimulus könnte ebenfalls zur verlängerten präanalytischen Lagerzeit beitragen. Die Viabilität von Granulozyten kann durch die Zytokinsekretion von anderen aktivierten Immunzellen erhöht werden. Hierdurch würden die negativen Effekte der Granulozyten-Aktivierung abgeschwächt. Unter anderem sind TNF- α und IL-8 Überlebensfaktoren für Granulozyten [260]. IL-8 wird in hohen Konzentrationen in den Proben unseres VB-ELISAs gefunden [246]. Unabhängig von Verbesserungen des granulozytären Umfelds könnte der VB-ELISA die Viabilität der T-Zellen durch weitere Mechanismen erhöhen. APC-Aktivierung findet durch den in den VB-ELISA Röhrchen befindlichen Stimulus früh statt und die kostimulatorischen Faktoren CD80 und CD86 (Liganden für CD28) werden exprimiert. Aktivierung von CD28 führt zur Akkumulation des anti-apoptotischen Mediators Bcl-X_L in T-Zellen und resultiert in erhöhter Viabilität der T-Zellen [261]. Dieser Effekt wird durch die artifizielle Zugabe von kostimulatorischen Faktoren unterstützt, deren Funktion in **Kapitel 4.4** diskutiert wird. Durch die frühere T-Zell-Aktivierung wird zusätzlich schneller IL-2 sezerniert, welches T-Zell-Viabilität, Proliferation und Effektor-Differenzierung fördert [262].

Der Vergleich von Studien aus der Literatur zur präanalytischen Lagerzeit und Transport zu unseren Daten ist jedoch limitiert, da externe Studien, v. a. in der Tuberkulose-Diagnostik, präanalytische Effekte zumeist mit dichotomen Ergebniskonversionen der Patientenproben korrelieren. Das Hauptaugenmerk muss daher in zukünftigen Studien auf Patientenproben nahe den Grenzwerten liegen. Diese Schwerpunktsetzung ist in der aktuellen Phase der Testentwicklung durch das Fehlen validierter Grenzwerte noch nicht möglich, sollte aber in den folgenden Entwicklungsphasen priorisiert werden. Die Robustheit der absoluten Zytokinkonzentrationen ist dennoch eine gute Annäherung und unsere Ergebnisse deuten auf ein robustes Testsystem hin, das mit hoher Wahrscheinlichkeit die entsprechenden Qualitätskriterien erfüllt.

Trotz des schlechten Abschneidens der PBMC-basierten Assays im Hinblick auf die Detektion von *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen nach prolongierter präanalytischer Lagerzeit ist ein sinnvoller Einsatz nicht ausgeschlossen. Methoden wie T Cell Xtend oder BD Vacutainer CPT könnten potenziell die präanalytische Lagerzeit verlängern. Die Firma Oxford Immunotec vertreibt T Cell Xtend, welches durch einen bivalenten Antikörper Erythrozyten mit Granulozyten verbindet und so für eine verbesserte Separierung von PBMCs und Granulozyten sorgt. Granulozyten verlieren mit verlängerter präanalytischer Lagerzeit an Densität und finden sich bei der PBMC-Isolation nach verlängerter präanalytischer Lagerzeit vermehrt in der PBMC-Schicht wieder [259]. T Cell Xtend wurde bereits extensiv in Verbindung mit dem T-Spot.TB getestet. Die Ergebnisse sind jedoch kontrovers. Während einige Publikationen von einer Verlängerung der maximalen präanalytischen Lagerzeit von bis zu 33 Std. berichten [242, 263, 264], konnte eine aktuelle Studie keinen Vorteil von T Cell Xtend für den T-Spot.TB finden [254]. In einer kleinen Pilotstudie konnten wir ebenfalls keinen signifikanten Gewinn durch die Verwendung von T Cell Xtend für die Detektion von *A. fumigatus*-spezifische T-Zellen finden (Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer Ansatz, die Zellfunktionalität über die präanalytische Lagerzeit für PBMC-basierte Assays zu präservieren, ist der Einsatz von BD Vacutainer CPT- oder vergleichbaren Röhrchen. Hierbei wird das Blut direkt in das CPT-Röhrchen abgenommen. In dem Röhrchen befindet sich eine Polyesterharzschicht, die das Blut vom im CPT-Röhrchen enthaltenen Ficoll trennt. Dadurch kann die PBMC-Isolation innerhalb des Röhrchens durch einen einfachen Zentrifugationsschritt nach der Entnahme durchgeführt werden, wodurch die Granulozyten frühzeitig von den PBMCs getrennt werden. Die frühe Trennung hat in Studien die Funktionalität der Immunzellen verbessert. CPT-Röhrchen stellten die durch präanalytische Lagerzeit verminderte IFN- γ -Sekretion von PBMCs im ELISPOT und in der Durchflusszytometrie wieder her [265, 266]. Auch CPT-Röhrchen waren in einer kleinen Pilotstudie nicht in der Lage, die Detektion von *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen vielversprechend zu verbessern (Daten nicht gezeigt).

4.2.3 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung der PBMCs hat ebenfalls einen starken Einfluss auf die Testleistung und ist nur für PBMC-basierte Assays relevant [244, 245]. *Aspergillus*-spezifische T-Zellen konnten mit den von uns evaluierten Protokollen für den ELISPOT und den ELISA nicht ohne starke Funktionalitätsveränderungen für die spätere diagnostische Analyse kryokonserviert werden. Die intra-individuellen Abweichungen der Zytokinkonzentrationen für IFN- γ , IL-5, IL-13 und IL-17 zwischen direkt nach Blutentnahme und kryokonservierten PBMCs waren zu groß, um eine sinnvolle Messung im diagnostischen Rahmen zuzulassen. Die Verwendung von kryokonservierten PBMCs für den ELISPOT führte zu einem Funktionsverlust der Zellen. Die ohnehin von Natur aus niedrigen Frequenzen von *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen und deren Zytokinsekretion wurden durch die Kryokonservierung artifiziell verringert. Daraus resultierte, dass Spender, die mit direkt nach der Blutentnahme isolierten PBMCs noch robust im ELISPOT detektiert werden konnten, nach Kryokonservierung auf ein kaum noch zu quantifizierendes Niveau fielen. Dies hätte potenziell eine Vielzahl von falsch-negativen Testergebnissen zur Folge. Das größte Problem in der ELISPOT- und ELISA-Analyse der kryokonservierten PBMCs war jedoch, dass eine hohe inter-individuelle Suszeptibilität bestand. So war die Rangfolge der Ergebnisse (die Höhe der Zytokinsekretion im Vergleich mit den anderen getesteten Spendern) multipler Spender nach Kryokonservierung grundlegend verändert [232].

In der Literatur existiert eine Vielzahl an Studien zum Einfluss der Kryokonservierung auf die Funktion von PBMCs/T-Zellen bei anderen Anwendungsgebieten. Die Ergebnisse sind jedoch divers. Auf der einen Seite wird, wie von uns beobachtet, von starken Veränderungen der Zellfunktionalität gesprochen [244, 245]. Auf der anderen Seite berichten Publikationen vom weitgehenden Erhalt der Funktion der T-Zellen [267, 268]. Auch wir waren in der Lage, kryokonservierte PBMCs in einer von drei Kryokonservierungskonditionen ohne Funktions- und Rangverlust mit dem durchflusszytometrischen CD154 *A. fumigatus*-Assay zu messen [232]. Mit diesem Ergebnis konnten wir die Daten von Wurster und Kollegen, die ebenfalls von einer Beibehaltung der Funktionalität von PBMCs nach Kryokonservierung im CD154 *A. fumigatus*-Assay berichteten, bestätigen [222]. Kryokonservierung ist daher mit dem

durchflusszytometrischen CD154 *A. fumigatus*-Assay grundsätzlich durchführbar. Dennoch verursacht die Kryokonservierung der PBMCs für adaptive *Aspergillus*-spezifische Immunassays aufgrund der schwierigen Standardisierung, des hohen Arbeitsaufwandes und des durch den Zellverlust bedingten größeren benötigten Blutvolumens Nachteile, die durch den VB-ELISA umgangen werden können.

Der VB-ELISA ermöglicht die Kryokonservierung von Proben. Es wird allerdings nicht das gesamte VB, sondern das Plasma nach der Stimulation kryokonserviert. Da weniger Arbeitszeit für die Generierung des Plasmas aus dem VB-ELISA als für die PBMC-Isolation benötigt wird, ermöglicht der VB-ELISA einen hohen Probendurchsatz mit der Möglichkeit zur Batch-Analyse (siehe unten) der gesammelten Proben im ELISA nach vorangegangener Kryokonservierung der Plasmaproben. Im VB-ELISA sind pro Spender ungefähr 15 Min. aktive Arbeitszeit nötig, bis das Plasma gewonnen und kryokonserviert ist. Aus der Tuberkulose-Diagnostik ist bekannt, dass das Plasma von stimuliertem VB sehr stabil ist. IFN- γ aus Plasmaproben des QFN-Tests konnte sowohl bei -20 °C als auch bei -80 °C ohne Veränderung der IFN- γ -Konzentration gemessen werden. Der Einfrier-/Auftauzyklus beeinflusst die IFN- γ -Konzentration nicht [249]. Die Plasmakonzentrationen von anderen Zytokinen neben IFN- γ wurden ebenfalls nicht durch die Kryokonservierung des Plasmas verändert [269, 270]. Dennoch sollten wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen vermieden werden, da in anderen Studien veränderte Zytokinkonzentrationen nach Einfrier-/Auftauzyklen gemessen wurden [269]. Hierbei unterscheiden sich Zytokine in ihrer Suszeptibilität. Während der Einfluss von wiederholten Einfrier-/Auftauzyklen auf bestimmte Zytokine wie IFN- γ gering ist, verändert sich die Konzentration von anderen Zytokinen bereits nach einem Zyklus [269].

Die Kryokonservierung der PBMCs bzw. der Plasmen ist die Voraussetzung für eine Batch-Analyse von *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen. Eine Batch-Analyse ist der Analyseprozess einer Vielzahl von Proben zur selben Zeit statt der Prozessierung einzelner Proben zur Zeit der Kollektion [271]. Daher sind nur mit dem VB-ELISA und (mit Abstrichen) der PBMC-basierten Durchflusszytometrie größere Batch-Analysen möglich. Alle PBMC-basierten Assays sind bei der Batch-Analyse durch den Schritt der PBMC-Isolation beschränkt. Nach unserer Erfahrung können

pro Operator maximal drei PBMC-Isolationen zeitgleich in einem akzeptablen Zeitrahmen ausgeführt werden. Die VB-basierte Durchflusszytometrie zur Analyse von *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen ermöglicht ebenfalls nur einen geringen Durchsatz von Patientenproben. Die limitierenden Faktoren dieser Methodik sind Personalaufwand für Probenvorbereitung (Erythrolyse), Färbung und Downstream-Datenanalyse.

Unsere Ergebnisse suggerieren, dass der PBMC-basierte durchflusszytometrische CD154-Assay und unser VB-ELISA die einzigen Assays sind, die sich zur Kryokonservierung eignen. Die Suszeptibilität der Zellen gegenüber der Kryokonservierung ist von verschiedenen Faktoren im Prozess der Kryokonservierung abhängig [259]. Diese Faktoren beinhalten die Zusammenstellung und Temperatur des Kryokonservierungsmediums, die Einfriergeschwindigkeit, die Länge und Temperatur der Lagerung sowie den Auftau- und Waschschrift [259]. Obwohl unsere Protokolle in Hinsicht auf diese Faktoren optimiert wurden, könnten abgeänderte Protokolle zu verbesserten Ergebnissen führen. Daher ist es nicht ausgeschlossen, dass mit anderen Kryokonservierungsprotokollen die Funktionalität des PBMC-basierten ELISAs und ELISPOTs für *A. fumigatus*-spezifische T-Zellen erhalten bleiben kann.

4.2.4 CD4 (Th-Zell)-Normalisierung

Funktionelle T-Zell-Assays können ausschließlich die sich in der Probe befindlichen CD4⁺ Zellen untersuchen. Wie viele dieser Zellen sich in der Probe befinden, ist jedoch vom individuellen Probanden abhängig. Daher können bei der CD4 Normalisierung die funktionellen T-Zell-Assay-Ergebnisse an die Anzahl der sich im peripheren Blut des Probanden befindlichen CD4⁺ Zellen angeglichen werden. Dies ist besonders für immunkompromittierte Hochrisikogruppen für *A. fumigatus*-assoziierte Pathologien relevant, wie z. B. Patienten nach alloSZT. Diese Patienten rekonstituieren ihr Immunsystem und besitzen daher für eine längere Zeit eine limitierte Anzahl von Th-Zellen [272]. Die Ergebnisse der Assays könnten daher an die Anzahl der Th-Zellen angeglichen werden, um die Aussagekraft der Assays potenziell zu erhöhen.

Sowohl die PBMC-basierten ELISAs und ELISPOTs als auch der VB-ELISA können nicht ohne die Hilfe anderer Assays auf CD4 normalisiert werden. Bei PBMC-basierten ELISAs und ELISPOTs kann zwar nicht auf die Anzahl der CD4-Zellen normalisiert werden, jedoch ist die PBMC-Anzahl durch das Protokoll der Assays standardisiert. Im VB-ELISA kann nur die Immunantwort der Zellen, die sich in den 500 μ L des eingespritzten Blutes befinden, gemessen werden. Die geringe Zellzahl könnte die verringerte Testleistung des VB-ELISAs im von uns durchgeführten Vergleich mit dem ELISPOT bei alloSZT Patienten in Proben mit weniger als 800 Lymphozyten/ μ L erklären [230]. Im Einklang mit unseren Ergebnissen führt die Durchführung des QFN-Tests mit weniger als 1500 Lymphozyten/ μ L zu einer erhöhten Anzahl nicht-auswertbarer Testergebnisse [243]. Die Assay-Plattform, die am besten auf CD4⁺-Zellen normalisiert werden kann, ist die Durchflusszytometrie. Dennoch benötigt man für ein CD4-normiertes Ergebnis zumindest die absolute Lymphozytenzahl des Patienten im peripheren Blut oder quantifiziert diese mittels *Counting Beads* in der durchflusszytometrischen Analyse. Abhilfe könnte für alle Assays eine grobe Normalisierung über kleine Blutbilder schaffen. Damit wäre es ohne großen Zusatzaufwand möglich, die Zellantworten auf die Lymphozytenzahl zu normalisieren. Eine Normalisierung auf die Anzahl der sich in der Probe befindlichen CD4⁺ T-Zellen ist jedoch auch mit dieser Methode nur in der Durchflusszytometrie möglich. Die Immunphänotypisierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie (unabhängiger Assay von dem CD154-basierten durchflusszytometrischen Assay zur Detektion von *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen), inklusive CD4, gehört an vielen Zentren zur Routinediagnostik bei alloSZT Patienten. Daher wäre es von großem Interesse, vor allem bei diesem Patientenkollektiv, in zukünftigen Studien neben den Messwerten *A. fumigatus*-spezifischer Zytokin-Assays auch eine CD4⁺ Zell normierte Analyse vergleichend zu evaluieren. Auf der einen Seite könnte die CD4-Normalisierung zu erhöhter Sensitivität und Standardisierbarkeit führen und die Diagnose bei Hochrisikopatienten für *A. fumigatus*-assoziierte Krankheiten wie alloSZT Patienten verbessern. Auf der anderen Seite könnten die nicht normalisierten Messwerte ein realistisches Bild des Immunstatus wiedergeben und nach der Identifikation von protektiven Grenzwerten für eine *Aspergillus*-Infektion eine realistische Risikostratifizierung der Patienten ermöglichen.

4.2.5 Komplexität der Laborausstattung und benötigtes Fachwissen

Die Komplexität der benötigten Laborausstattung sowie das notwendige Fachwissen des Personals unterscheiden sich gravierend zwischen den unterschiedlichen Assay-Plattformen.

Ein Inkubator ist für alle Plattformen notwendig und ist in so gut wie allen Laboratorien vorhanden. Für die sterile Isolation und Stimulation der PBMCs sowie für die Addition von Brefeldin A für die PBMC- und VB-basierte Durchflusszytometrie wird eine mikrobiologische Sicherheitswerkbank der Klasse II benötigt. Diese gehört ebenfalls zur Standardausrüstung der meisten mikrobiologischen Labore. Hierbei ist der Zeitpunkt, ab wann eine Sicherheitswerkbank der Klasse II benötigt wird, wichtig für den Prozessablauf. Umso später die Sicherheitswerkbank gebraucht wird, desto schneller kann die Stimulation in einer Umgebung ohne Sicherheitswerkbank eingeleitet werden. Dadurch können die negativen Einflüsse einer prolongierten präanalytischen Lagerzeit (siehe **Kapitel 4.2.2**) vermieden bzw. vermindert werden. Nach Einleitung der Stimulation kann die Probe an ein Labor mit Sicherheitswerkbank der Klasse II zur weiteren Verarbeitung und Analyse gesendet werden. Für die PBMC-basierten Assays ist die Sicherheitswerkbank bereits vor der Stimulation notwendig. In der VB-basierten Durchflusszytometrie wird eine Sicherheitswerkbank der Klasse II für das Hinzufügen des Brefeldin A erst 4 Std. nach Beginn der Stimulation benötigt. Dennoch könnte eine mikrobiologische Sicherheitswerkbank der Klasse II in manchen peripheren Zentren nicht zur Verfügung stehen. Der VB-ELISA ist auf keine Sicherheitswerkbank angewiesen, da die Stimulation im Röhrchen selbst stattfindet und die Folgeschritte unsteril ausgeführt werden können.

Zur Ergebnisgenerierung benötigen alle drei Plattformen unterschiedliche Auslesegeräte. Für den ELISA wird ein Mikroplatten-Lesegerät benötigt. Dieses Gerät ist in den meisten Laboratorien vorhanden. ELISPOT-Auslesegeräte sind in großen Laboratorien ebenfalls häufig vorhanden. Eine zentrale Auswertung der Platten in einem Labor ist jedoch nach der Durchführung des ELISPOTs ebenfalls möglich. Zusätzlich besteht die Möglichkeit bestimmte ELISPOTs mit Hilfe eines Mikroskops auszulesen. Die Auslesung mit Hilfe eines Mikroskops führt jedoch zu einem erhöhten Arbeitsaufwand und einer verringerten Standardisierbarkeit. Durchflusszytometer

hingegen sind zumeist nur an Universitätskliniken und in großen Laboratorien verfügbar und teuer in der Anschaffung, Wartung und den Betriebskosten.

Die experimentelle Durchführung der unterschiedlichen Assays ist prinzipiell simpel. In der Auswertungskomplexität gibt es jedoch entscheidende Differenzen. Die Auswertung des ELISAs und ELISPOTs ist einfach und von Laborpersonal mit geringer Erfahrung durchführbar. In beiden Fällen werden von dem Gerät Ergebnisse ausgelesen, die danach in eine Vorlage eingetragen werden und durch vorab bestimmte Grenzwerte leicht zu interpretieren sind. Die Analyse der durchflusszytometrischen Daten ist komplexer. Auf Grund der geringen Anzahl von CD154-exprimierenden spezifischen Th-Zellen bei *A. fumigatus*-Stimulation wird erfahrenes und geschultes Personal benötigt. Eine gewisse Subjektivität, insbesondere bei der *Gate*-Setzung in der Analysesoftware, ist zudem bei der durchflusszytometrischen Auswertung kaum zu vermeiden.

Die Automatisierung von ELISAs und ELISPOTs ist möglich und könnte Arbeitsaufwand und Kosten verringern und die Standardisierbarkeit erhöhen. Auch für die Durchflusszytometrie gibt es Versuche, den Färbungs- und *Gating*-Prozess zu automatisieren [273-277]. Für die Entwicklung unseres Tests dürfte allerdings nur die Automatisierung des *Gatings* des CD154 durchflusszytometrischen Assays und die Durchführung des ELISAs realistisch sein und selbst dieses Vorhaben ist bei den sehr geringen spezifischen T-Zell-Frequenzen schwierig. Geräte zur Automatisierung von ELISAs sind bereits in einigen mikrobiologischen Laboren vorhanden. In großen Studien mit verschiedenen Zentren könnte die dadurch resultierende erhöhte Standardisierbarkeit ein großer Vorteil sein.

Durch die Notwendigkeit von gut ausgebildetem Personal und die geringe Verfügbarkeit von Durchflusszytometern außerhalb von Universitätskliniken und deren hohe Anschaffungskosten scheint die durchflusszytometrische Detektion von *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen insgesamt am schwierigsten in die Routinediagnostik übertragbar zu sein. Sowohl ELISPOT- als auch ELISA-basierte Assays sind bereits mit weniger aufwendigerer und oft bereits verfügbarer Ausstattung durchführbar. Zudem ist eine geringere Einarbeitungszeit der Operatoren erforderlich. Der VB-ELISA überzeugt im Vergleich mit den anderen Assays zur Detektion von *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen aufgrund seiner geringen Komplexität und Kosten sowie

seiner einfachen Durchführung und Analyse. Auch die Notwendigkeit einer Sicherheitswerkbank zeitnah nach der Blutentnahme entfällt. Diese Vorteile ermöglichen dem Assay nicht nur einen Einsatz in westlichen Ländern, sondern potenziell auch in Entwicklungsländern, die eine hohe Fallzahl von *Aspergillus*-assoziierten Erkrankungen aufweisen [278, 279]. Ein mit den dort verfügbaren Mitteln durchführbarer Test könnte zu einer erheblichen Verbesserung der Patientenversorgung in diesen Ländern führen [278, 279].

4.3 Stimulationsumfeld

Unsere und andere Studien beschreiben eine verbesserte Stimulationsfähigkeit und erhöhte Reproduzierbarkeit von VB-Assays gegenüber PBMC-Assays [174, 246, 280-282]. Diese Ergebnisse resultieren aus dem physiologischeren Stimulationsumfeld in VB-Assays. In VB-Assays werden die Immunzellverhältnisse konserviert und Thrombozyten sowie Granulozyten bleiben im Gegensatz zu PBMC-basierten Assays im Test erhalten. Granulozyten beeinflussen die Art der adaptiven Immunantwort und sind in sekundäre Rückkopplungsmechanismen involviert [246, 282]. Sie werden im VB-ELISA sowohl von *A. fumigatus*-Lysat als auch von PHA aktiviert. Diese Aktivierung steht jedoch, wie von uns beschrieben, in starker Abhängigkeit von den T-Zellen, da eine T-Zell-Depletion diese Aktivierung weitgehend mitigiert [246]. Somit bleibt das Testergebnis des VB-ELISA von der T-Zell-Aktivierung abhängig und damit T-Zell spezifisch. Wir konnten beobachten, dass NK- und NKT-Zellen im System nur minimal aktiviert werden, was aufgrund ihrer INF- γ -Sekretion insbesondere für Th1-Analysen relevant ist [246].

4.4 Kostimulation zur Verbesserung der Stimulationsumgebung in T-Zell-Assays

Die Detektion von Schimmelpilz-spezifischen T-Zellen gestaltet sich auf Grund ihrer niedrigen Frequenzen als schwierig. Daher wurden für ihre Detektion in durchflusszytometrischen Assays

kostimulatorische Faktoren eingesetzt, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern [151, 174, 175, 219, 222]. Kostimulatorische Faktoren wurden vor dieser Arbeit nur in der durchflusszytometrischen Detektion von Schimmelpilz-spezifischen T-Zellen hinzugefügt [151, 174, 175, 219, 222]. In den Assayplattformen ELISA und ELISPOT wurde für die Detektion von Schimmelpilz-spezifischen T-Zellen jedoch noch keine kostimulatorischen Faktoren eingesetzt. Kostimulatorische Faktoren könnten auch in diesen Assayplattformen zu einer Verbesserung der Testleistung beitragen.

Nach unserem Wissen werden in kommerziell erhältlichen T-Zell-Assays keine kostimulatorischen Faktoren eingesetzt. Die Hersteller könnten vermuten, dass kostimulatorische Faktoren die Hintergründe der Assays erhöhen und daher zu einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis führen. Zusätzlich könnte befürchtet werden, dass die Addition von kostimulatorischen Faktoren potenziell zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Kontaminationen (z. B. bei der Blutentnahme) führen könnte. Die Reaktion der Zellen auf kleinere Kontaminationen könnte verstärkt werden und so die Ergebnisse des Tests verfälschen. Wir haben jedoch trotz des Einsatzes von kostimulatorischen Faktoren nur sehr geringe Hintergründe im VB-ELISA sowie in der VB-basierten Durchflusszytometrie und in den PBMC-basierten Assays (ELISA, ELISPOT und Durchflusszytometrie) detektiert [174, 232, 246]. Das Signal-Rausch-Verhältnis wurde im VB-ELISA durch erhöhte Zytokinkonzentrationen in den stimulierten Röhren bei geringen Hintergründen verbessert [246]. Das bringt entscheidende Vorteile. Zum einen könnte durch die höheren Zytokinkonzentrationen die Reproduzierbarkeit des Assays gesteigert werden (siehe **Kapitel 4.2.1**). Zum anderen könnten die meisten Zytokinkonzentrationen auch in konventionellen ELISAs gemessen werden. Die mit dem VB-ELISA gemessenen IFN- γ -, IL-4-, IL-5-, IL-13- und IL-17-Konzentrationen sind zumeist im Bereich zwischen 1 und 50 pg/mL. Die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 wurden in Patientenproben selbst mit Kostimulation nur in einer Mediankonzentration von unter 10 pg/mL detektiert [246]. Da im VB-ELISA das Blut 1:2 mit RPMI verdünnt wird, liegen die tatsächlich im ELISA zu detektierenden Zytokinkonzentrationen ohne Verdünnungsfaktor selbst mit der Addition von kostimulatorischen Faktoren zumeist zwischen 0,5 und 25 pg/mL. Diese Zytokinkonzentrationen wurden mit einem Luminex-Assay, der eine hohe Sensitivität besitzt, robust gemessen. Um die

Kosten des Tests in der Routineanwendung zu senken, sollten die einzelnen Zytokine später jedoch mit konventionellen ELISA gemessen werden können, die bei Zytokinkonzentrationen von unter 5 pg/mL zumeist an ihr Detektionslimit kommen. Eine Alternative sind *High Sensitivity*, konventionelle ELISA, die ebenfalls niedrige Zytokinkonzentrationen zuverlässig quantifizieren können. Diese sind jedoch teurer als konventionelle ELISA.

Der VB-ELISA zeigte im Gegensatz zu den anderen Assays geringe Suzeptibilität bei verlängerten präanalytischen Lagerzeiten von bis zu 8 Std. Dies könnte ebenfalls zum Teil auf die kostimulatorischen Faktoren zurückzuführen sein (siehe **Kapitel 4.2.2**).

Ein weiterer Vorteil des Einsatzes von kostimulatorischen Faktoren ist die Unterstützung der T-Zell-Antwort. Einige Zytokine werden von mehreren Zelltypen exprimiert [283-285]. IFN- γ wird z. B. von T-Zellen und NK-Zellen sezerniert [283]. In der Durchflusszytometrie ist es möglich, die Aktivierung unterschiedlicher Zellpopulationen mit dem gleichen Aktivierungsmarker anhand von Zellpopulationsmarkern zu unterscheiden. ELISPOT und ELISA sind dazu nicht in der Lage. Sie können nur die allgemeine Zytokinkonzentration in der Probe messen. Welche Zellpopulation/en für die Zytokinsekretion verantwortlich ist/sind, kann hingegen nicht nachverfolgt werden. Bei funktionellen T-Zell-Assays besteht die Intention, die Zytokinsekretion von T-Zellen möglichst spezifisch zu detektieren, da diese im Gegensatz zu Zellen der innate Immunität durch ihre Antigenspezifität und Gedächtnisfunktion eine an Exposition und Erkrankung angepasste Antwort geben. Die kostimulatorischen Faktoren unterstützen die T-Zell-Antwort, die dadurch ein größeres Gewicht im Testergebnis bekommt.

Im Bereich der Schimmelpilzdiagnostik werden drei kostimulatorische Faktoren in unterschiedlichen Kombinationen zu den Assays hinzugefügt: α -CD28, α -CD40 und α -CD49d [151, 172, 175, 219, 222]. In den durchgeführten Assays wurden hauptsächlich α -CD28 und die Kombination aus α -CD28 und α -CD49d eingesetzt [232, 246]. Die beste kostimulatorische Kondition für VB-Assays war eine Kombination aus α -CD28 und α -CD49d [174, 246].

α -CD28 stimuliert den auf T-Zellen befindlichen CD28-Rezeptor und ist der Prototyp eines kostimulatorischen Faktors. Durch die simultane Stimulation von CD28 und dem TCR werden

T-Zellen aktiviert. CD28 verstärkt das TCR-Signal und aktiviert zusätzliche Signalmoleküle [261]. Unter anderem werden Transkriptionsfaktoren aktiviert und transloziert, die zur Ansammlung von Proteinen für den Eintritt in den Zellzyklus führen und daher die T-zelluläre Proliferation begünstigen. Die Sekretion von IL-2 wird ebenfalls erhöht und damit die Expression des IL-2 Rezeptors gesteigert [261]. Zudem schützt die CD28-Kostimulation T-Zellen, wie bereits in **Kapitel 4.2.2** beschrieben, vor der Apoptose. Durch die verstärkte Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-X_L wird sowohl dem intrinsischen als auch dem extrinsischen Apoptoseweg entgegengewirkt [261]. α -CD28 Kostimulation unterstützt daher in unseren Assays die T-Zell-Aktivierung und wirkt deren Apoptose entgegen. Es trägt somit insgesamt zur besseren Detektion von *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen bei.

α -CD40 wurde in unserem Assay nur in der Evaluation des ELISPOTs eingesetzt, da von uns im VB-Assay keine Verbesserung der T-Zell Stimulation festgesellt werden konnte [174]. Daher wird der Einfluss der CD40-Kostimulation hier nicht weiter diskutiert.

α -CD49d ist ebenfalls ein kostimulatorischer Faktor für T-Zellen. α -CD49d erhöht die Adhäsion und das Rollen von Lymphozyten am Endothel und unterstützt so die Entzündungsreaktionen im Körper [108]. Unsere Ergebnisse zeigten, dass das Hinzufügen von α -CD49d die detektierbare *A. fumigatus*-spezifische T-Zell-Frequenz im VB durchflusszytometrischen CD154-Assay erhöht [174]. Ebenfalls stellten wir fest, dass Immunsuppressiva im Blut von immunsupprimierten Patienten dieselben T-Zell-Frequenzen verringern und dass die Addition von α -CD49d den negativen Effekt der Immunsuppressiva Cyclosporin A und Prednisolon auf die Ergebnisse des PBMC- und VB-basierten durchflusszytometrischen Tests zur Detektion von *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen abschwächt. Das Hinzufügen von α -CD49d könnte daher die Anzahl der falsch negativen Testergebnisse bei immunsupprimierten Patienten verringern [221]. Neben unseren Assays wird α -CD49d auch in anderen VB-Assays mit hoher Reproduzierbarkeit eingesetzt [286]. Gesteigerte detektierbare T-Zell-Frequenzen und Zytokinsekretion nach *A. fumigatus*-Stimulation mit geringen Hintergründen sowie der Verminderung des Einflusses von pharmakologischer Immunsuppression machen CD49d zu einer sinnvollen Ergänzung im entwickelten VB-ELISA [221, 246].

4.5 Unterschiede zwischen PBMC- und VB-basierten *A. fumigatus*-T-Zell-Assays

Basierend auf den in den vorherigen Kapiteln herausgearbeiteten Vorteilen sind VB-basierte Assays insgesamt vielversprechender und geeigneter für die Detektion von *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen als PBMC-basierte Tests. Sie erfordern weniger aktive Arbeitszeit, verursachen geringere Kosten, sind einfacher zu standardisieren, benötigen ein geringeres Blutvolumen und eine weniger komplexe Laborausstattung [174, 246]. Außerdem bieten VB-Systeme ein physiologischeres Umfeld als PBMC-basierte Systeme [246].

Die nicht erforderliche PBMC-Isolation in den VB-Assays bedeutet die größte Verminderung von aktiver Arbeitszeit. Bei der VB-basierten Durchflusszytometrie muss statt der PBMC-Isolation nach der Stimulation eine Erythrolyse durchgeführt werden, dennoch wird die aktive Arbeitszeit verringert [174]. Der VB-ELISA benötigt weder eine PBMC-Isolation, noch ist eine Erythrolyse notwendig. Daher ist der VB-ELISA der Assay mit dem geringsten Arbeitsaufwand.

VB-Assays benötigen zudem weniger Blutvolumen. Für den VB-ELISA werden 0,5 mL Blut je Kondition benötigt. Der QFN-Test wird mit 0,8 bis 1,2 mL pro Röhrchen befüllt. Bei zwei Stimulationskonditionen zusätzlich zur Negativ- und Positivkontrolle würden so 2 mL für den VB-ELISA und ca. 4 mL für den QFN-Test benötigt [250]. Der PBMC-basierte T-Spot.TB benötigt bei Erwachsenen laut Herstellerangaben 6 mL Blut, wobei empfohlen wird das Blutvolumen bei immunkompromittierten Patienten zu verdoppeln [287]. Im Gegensatz zu den soeben genannten Assays benötigt die PBMC-basierte Durchflusszytometrie nach unserer Erfahrung mindestens 15 mL Blutvolumen. Obwohl der entwickelte VB-ELISA mit nur einem Drittel des Blutvolumens des T-Spot.TB und der Hälfte des Volumens des QFN auskommt, sind die benötigten Blutmengen von allen Tests und stellen daher selbst bei longitudinaler Testung keine Gefahr für den Patienten dar. Das geringere benötigte Blutvolumen des VB-ELISAs könnte sich jedoch in Studien mit vielen

benötigten Stimuli bei pädiatrischen Patienten sowie bei Patienten nach alloSZT als Vorteil herausstellen.

Auf Grund der vielen Vorteile der VB-basierten Assays sollte sich die Entwicklung von Assays für *A. fumigatus*-spezifische T-Zellen auf VB-basierte Assays konzentrieren. In die Gruppe der VB-basierten Assays fallen neben unserem VB-ELISA der QFN-TB/CMV und der TruCulture-Assay. Für die VB-basierten ELISAs wird das Blut entweder in ein Stimulationsröhrchen injiziert (VB-ELISA) oder direkt in ein Stimulationsröhrchen abgenommen (QFN, TruCulture). In den Stimulationsröhrchen kommt das Blut in Kontakt mit dem Stimulus (QFN) oder mit dem Stimulus und zusätzlichem Medium (VB-ELISA, TruCulture).

Der von uns entwickelte VB-ELISA setzt sich von QFN und TruCulture durch die duale Kostimulation mit α -CD28 und α -CD49 (siehe **Kapitel 4.4**) ab. Zusätzlich haben wir im Gegensatz zu diesen Assays den VB-ELISA für die Stimulation mit Schimmelpilzen optimiert. Schimmelpilzstimuli werden weder von TruCulture noch von QFN angeboten.

4.6 Auswahl sowie Herstellung von *A. fumigatus*-Antigenen und der Einfluss von Endotoxinen auf funktionelle T-Zell-Assays

Die Auswahl der im Test verwendeten Antigene ist entscheidend für die Leistung des T-Zell-Assays. Die Detektion der Pathogene in den kommerziell erhältlichen T-Zell-Tests basiert auf klar definierten und stark immunogenen Proteinen. Für CMV-T-Zell-Assays wird pp65 und *immediate-early 1* (IE-1) verwendet [288, 289], während der QFN-Test für Tuberkulose mit den Antigenen *early secreted antigen target* (ESAT)-6, *culture filtrate protein* (CFP)-10, TB-7.7 stimuliert wird [290]. Für *Aspergillus*-assoziierte Krankheitsbilder stellt die optimale Auswahl der Antigene bislang eine große Unbekannte dar. In den allermeisten Fällen wird in T-Zell-Assays ein Myzellysat von *A. fumigatus* verwendet [151, 172, 173, 222].

Die Herstellung von mykologischen Lysaten ist aus verschiedenen Gründen schwierig zu standardisieren. Zum einen sind Lysate mit vergleichbarer Stimulationsfähigkeit auf Grund des

ungleichen Wachstums des Pilzes für die Herstellung verschiedener Lysat-Herstellungszyklen schwierig zu reproduzieren. Zum anderen beinhaltet Lysat eine Vielzahl an Proteinantigenen, die zu Kreuzreaktionen mit anderen Pilzen und dadurch zu falsch-positiven Testergebnissen führen können. Außerdem können in Lysaten Pilzbestandteile wie z. B. β -Glucan und Chitin enthalten sein, die vergleichbar mit Endotoxinverunreinigungen über die PRRs eine unspezifische Immunantwort auslösen (siehe unten) [1].

Proteinantigene können im Gegensatz dazu in hoher Qualität und Standardisierbarkeit hergestellt werden, da diese in Bakterienkulturen produziert werden. Außerdem können Proteinantigene, falls möglich, so gewählt werden, dass Antigene, die Kreuzreaktionen mit anderen Mikroben auslösen, nicht zur Stimulation verwendet werden. Zur Etablierung des VB-ELISAs wurde neben dem *A. fumigatus* Myzellysat das Proteinantigen Aspf4 verwendet. Alle Proteinantigene wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Frank Ebel an der Ludwig-Maximilians-Universität München hergestellt. Aspf4 wurde auf Grund seiner Immunogenität und seiner in der Literatur beschriebenen Fähigkeit, Asthmatiker mit *Aspergillus*-Sensitivierung von Asthmatikern mit ABPA zu unterscheiden, ausgewählt [291, 292].

Kontaminationen des Testsystems mit Endotoxinen können zu falsch-positiven Ergebnissen in IGRAs führen [293, 294]. Endotoxine werden über die PRRs auf den Zellen des innate Immunsystems erkannt und aktivieren dieselben. Eine unspezifische IFN- γ -Sekretion von NK-Zellen nach PRR-Aktivierung kann beispielsweise das IGRA-Testergebnis direkt beeinflussen. Aber auch T-Zellen können indirekt von Endotoxinen aktiviert werden. Endotoxine stimulieren PRRs auf APCs, die dadurch reifen und T-Zellen unspezifisch aktivieren [295].

Endotoxine gelangen hauptsächlich durch mit Endotoxin belastete Antigene in das Testsystem. Der Grund für die Antigenverunreinigung mit Endotoxinen ist deren Produktion mit Hilfe von Bakterienstämmen [229]. Um einen Einfluss von Endotoxinen auf das Testergebnis zu verhindern, wurde für unseren VB-ELISA ein sehr konservativer Grenzwert von 1 EU/mg Antigen festgelegt. Alle von uns verwendeten Antigene befanden sich somit unter 1 EU/mg. Nur die Antigene für den ELISPOT wurden bis 3,67 EU/mg eingesetzt (EU-Grenzwert des ELISPOT wurde in der Doktorarbeit von Sonja Etter validiert). Strikte Endotoxin-Grenzwerte stellen jedoch hohe

Anforderungen an die Antigenproduktion. Einige Chargen von Proteinantigenen waren auf Grund zu hoher Endotoxinkonzentrationen für unsere Assays deshalb nicht einsetzbar. Des Weiteren wurden Unterschiede in der Reaktivität des Immunsystems auf diverse Herstellungszyklen desselben Antigens festgestellt [246]. Während in unseren publizierten Studien nur Antigene aus einem Herstellungszyklus für vergleichende Experimente verwendet wurden, können aufgrund der Varianzen der Antigenqualität mit den aktuellen Herstellungsprozessen keine größeren klinischen Studien durchgeführt werden. Daher sollte ein Produktionsprozess auf industriellem Niveau mit regelmäßigen Qualitätskontrollen für die weitere Produktion der Proteinantigene genutzt werden. Neben der Antigenproduktion können Endotoxine auch durch Verunreinigungen im Testmaterial wie den Monovetten in das Testsystem gelangen und das Testergebnis verfälschen [293]. In allen T-Zell-Assays sollte daher darauf geachtet werden nur Endotoxin-freie Reagenzien und Materialien zu verwenden. Endotoxine können sich aber auch direkt im Patientenblut befinden. Dies kann verschiedene Gründe haben. Sie können z. B. aus dem Magen-Darm-Trakt in die Blutzirkulation gelangen [296]. Aber auch Bakteriämien können für Endotoxine im Blut verantwortlich sein [297].

4.7 Anwendungsgebiete und Limitationen für T-Zell-Assays in der experimentellen und klinischen Mykologie

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass die Ergebnisse von T-Zell-Assays Hinweise auf *A. fumigatus*-assoziierte Krankheiten geben können (siehe **Kapitel 1.4.3**). Wie aus den vorhergehenden Kapiteln deutlich hervorgeht, erfüllt der VB-ELISA alle Kriterien für einen potenziellen Routinetest und übertrifft die alternativ getesteten Assays zur Detektion von *A. fumigatus*-spezifischen T-Zellen. Daher wurde der VB-ELISA für eine Pilotstudie in einer Patientengruppe mit *Aspergillus*-assoziierten Krankheitsbildern ausgewählt. Mit dem entwickelten VB-ELISA konnten deutliche Unterschiede in den Th1-, Th2- und Th17-Zytokinkonzentrationen zwischen einer Patientengruppe mit *Aspergillus*-assoziierten Lungenkrankheitsbildern und einer Kontrollpatientengruppe mit *Aspergillus*-unabhängigen

chronischen Lungenpathologien festgestellt werden [246]. Dies steht im Einklang mit der in den **Kapiteln 1.3.4** und **1.4.3** diskutierten Literatur. Auf Grund dieser vielversprechenden Ergebnisse sollte der Nutzen des VB-ELISAs in Studien mit erhöhter Patientenzahl und klarer definierten Patientengruppen evaluiert werden und die Ergebnisse aus dieser Studie sollten mit begrenzter Patientenzahl bestätigt werden.

In unseren Experimenten zeigten auch gesunde, intensiv *Aspergillus*-exponierte ökologische Landarbeiter einen weitgehend balancierten Anstieg von Th1- und Th2-Frequenzen und -Zytokinsekretion nach *A. fumigatus*-Stimulation. Eine Erhöhung der Th1- und Th2-Antwort nach *A. fumigatus*-Stimulation muss dementsprechend nicht unbedingt auf eine *Aspergillus*-assoziierte Hypersensitivitätskrankheit hinweisen. Im Gegensatz zu der Patientengruppe mit *Aspergillus*-assoziierten Lungenpathologien konnten bei den exponierten ökologischen Landarbeitern allerdings nur minimale Anstiege der Th17-Frequenz und Zytokinsekretion gemessen werden [298]. Erhöhte IL-17-Konzentrationen und -Frequenzen sind daher ein vielversprechender potenzieller Biomarker für die Detektion dieser Krankheitsbilder [154, 298]. Jedoch wurden auch erhöhte Th2/Th1-Verhältnisse bei Patienten mit fungaler Persistenz und Hypersensitivitätskrankheitsbildern wie Asthma und ABPA nachgewiesen [143, 152, 299, 300]. Interessanterweise zeigte sich auch bei den von uns untersuchten ökologischen Landarbeitern ohne nachgewiesene Hypersensitivität bei langjähriger Exposition ein Trend zur verstärkten Th2 Polarisation [298]. Die Konzentration auf ein einzelnes Zytokin wäre in diesem Stadium der Testentwicklung daher falsch. Es sollte auch weiter nach Kombinationen von verschiedenen Zytokinen als zuverlässige Marker gesucht werden. Unsere Daten zeigen, dass die kombinierte Quantifizierung von verschiedenen Zytokinen die Detektionsleistung des Tests erhöht [246]. Im Einklang mit unseren Ergebnissen konnten Bacher und Kollegen akute ABPAs ebenfalls nur mit der Kombination aus erhöhten *Aspergillus*-spezifischen IL4⁺ und IL17⁺ Th-Zellfrequenzen detektieren [154].

Die idealen Antigene für adaptive *A. fumigatus* T-Zell-Tests sind weitgehend unbekannt und es existieren kaum vergleichende Studien. Im Gegensatz zur Stimulation mit dem *A. fumigatus*-Myzellysat war es mit AspF4 nicht möglich, Patientengruppen mit

A. fumigatus-assoziierten Krankheitsbildern von der Kontrollpatientengruppe zu unterscheiden [246]. In diesem Zusammenhang konnten wir in den beruflich intensiv-*Aspergillus*-exponierten ökologischen Landarbeitern mit Hilfe des ELISPOTs drei vielversprechende *Aspergillus*-Antigene identifizieren: AspF22, CatB und CipC [siehe Dissertation von Frau Sonja Etter] [298]. Diese drei Antigene sollten nun in relevanten Krankheitsbildern wie der ABPA evaluiert werden [298].

AlloSZT-Patienten sind eine Hochrisikogruppe für IAs [8]. Neben der Evaluation der von uns entwickelten Assays im Bereich der *Aspergillus*-assoziierten Hypersensitivitätskrankheiten und im arbeitsmedizinischen Bereich wurde daher die Durchführbarkeit dieser Assays in alloSZT-Patienten evaluiert [8, 230]. Auf Grund der niedrigen IA-Inzidenzen in dieser Patientengruppe wurde zusätzlich zur Validierung unserer Assays die HCMV-Reaktivierung, die bei diesen Patienten zu einer Zytomegalie führen kann, durch die Stimulation mit dem HCMV-Antigen pp65 in unseren T-Zell-Assays nachverfolgt. Alle Assays zeigten eine hohe Konkordanz zur HCMV-Serologie und konnten mit hoher technischer Erfolgsrate durchgeführt werden. Während der ELISPOT als Assayplattform in dieser Patientenkohorte die beste technische Testleistung zeigte, war die Testleistung des logistisch vorteilhaften VB-ELISAs ab 800 Lymphozyten/ μ L vergleichbar [230]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der VB-ELISA auch für die Detektion der IA bei immunkompromittierten Patienten eingesetzt werden könnte. Im Beobachtungszeitraum ist jedoch in dieser Studie kein Patient an einer IA erkrankt [230]. Dass die Detektion von IMIs bei alloSZT Patienten mit diversen T-Zell-Assays möglich ist, wurde bereits gezeigt und sollte daher mit unserem VB-ELISA in einer größeren Patientenkohorte bei Patienten mit über 800 Lymphozyten/ μ L (Range bei Gesunden im genutzten Assay: 1000 – 4050 Lymphozyten/ μ L) evaluiert werden [172, 173, 213, 214, 301]. Da die funktionelle T-Zell-Analyse bei immunkompromittierten Patienten auf Grund von einer hohen Anzahl von nicht-auswertbaren Tests und der Notwendigkeit einer longitudinalen Testung eine große Herausforderung darstellt [172, 173], sollte neben dem Versuch, IAs zu detektieren, auch überprüft werden, ob der Assay protektive Grenzwerte bei diesen Patienten nachweisen kann, die vorhersagen, ob ein Patient durch sein Immunsystem gegen den Schimmelpilz geschützt ist. Die Möglichkeit einer derartigen Risikostratifizierung auf Grund von protektiven IFN- γ -Grenzwerten wurde mit funktionellen T-Zell-Assays bereits für die Anwendung bei HCMV-

Reaktivierungen nachgewiesen [196]. Ähnliche Konzepte mit einem größeren Zytokinspektrum sind auch für die IA denkbar und sollten evaluiert werden.

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse, die mit T-Zell-Assays erzielt werden konnten, wurden mögliche negative Einflussfaktoren für diese Tests identifiziert. Wenn man die Informationen über den Einfluss von Störfaktoren auf den QFN-Test verallgemeinert, können vier kritische Faktoren für die erfolgreiche Anwendung eines neuen T-Zell-Tests identifiziert werden.

i) **Koinfektionen**, die über Endotoxine oder andere PAMPs PRRs im Blut aktivieren (**siehe Kapitel 4.6**), sind höchstwahrscheinlich ein Ausschlusskriterium für den sinnvollen Einsatz eines T-Zell-Assays. So wurde beispielsweise gezeigt, dass pulmonale Infektionen mit nichttuberkulösen Mykobakterien (NTMs) zu falsch-positiven QFN-Tests führen können [302]. Virale Infektionen können ebenfalls einen Einfluss auf das QFN-Testergebnis haben [302, 303]. Zum Beispiel verringerte eine Koinfektion mit Humanen-Immundefizienz-Viren (HIV) die Sensitivität des QFN-Tests [303]. Die Testleistung wurde durch die von der HIV-Infektion verringerten und funktional eingeschränkten Th-Zellen negativ beeinflusst [302]. Da IAs auch bei von HIV-infizierten Patienten vorkommen, werden in dieser Patientengruppe wahrscheinlich ähnliche Einschränkungen für den VB-ELISA bestehen. Starke durch HIV verursachte funktionelle Einschränkungen können jedoch an Hand von einer Unterschreitung der Grenzwerte für die Positivkontrolle ausgeschlossen werden [302]. Es ist jedoch nahezu unbekannt, ob und welche Koinfektionen Pilz-spezifische Immunantworten beeinflussen. Eine separate Exploration des VB-ELISAs in diesen Patientengruppen ist notwendig.

ii) **Kreuzreaktionen** können die Spezifität von T-Zell-Assays negativ beeinflussen und zu falsch positiven Ergebnissen führen. Analog zum Einfluss von NTMs auf die Testergebnisse des QFNs sind Kreuzreaktionen auch in der klinischen Mykologie relevant. So beruht beispielsweise die Entstehung von *A. fumigatus*-reaktiven Th17-Zellen auf einer Kreuzreaktion. *A. fumigatus*-reaktive Th17-Zellen werden im Darm durch die Konfrontation der Th-Zellen mit dem humanen kommensalen Pilz *C. albicans* gebildet [154]. *Rhizopus oryzae*-spezifische Th-Zellen zeigten IFN- γ -Antworten auf einige, aber nicht alle Mucorales-Spezies sowie auf andere Pilze wie *A. fumigatus*, *Penicillium chrysogenum* und *C. albicans* [304]. *A. fumigatus*-spezifische T-Zellen

können ebenfalls durch klinische Isolate von Hefen oder Schimmelpilzen aktiviert werden [305, 306]. Zusätzlich korrelieren die Frequenzen von *Aspergillus*- und Mucorales-spezifischen T-Zellen bei gesunden Spendern [151]. Es ist allerdings unklar, ob diese Beobachtung auf einer Kreuzreaktion oder kombinierten Exposition beruht, da *Aspergillus* und Mucorales ähnliche biologische Nischen besiedeln [151, 307-309]. Kreuzreaktivität kann in bestimmten klinischen Szenarien sogar gewünscht sein, z. B. um in einem Suchtest ein breites Erregerspektrum invasiver Mykosen zu erkennen, kann aber auch mit dem Ziel einer Erreger-spezifischen Diagnostik oder mit gutachterlichen Fragen interferieren [172].

iii) **Pharmakologische Immunsuppression** hat einen negativen Einfluss auf die Detektionsleistung von T-Zell-Assays [221, 310-313]. Wir konnten zeigen, dass auch die Detektion von *Aspergillus*-spezifischen T-Zellen in sowohl PBMC- als auch VB-basierten T-Zell-Assays von Immunsuppressiva gesenkt wurde [221]. Die durch die Immunsuppressiva verminderte Detektionsleistung konnten wir, wie bereits in **Kapitel 4.4** beschrieben, durch die Addition von α -CD49d abschwächen [221]. Jedoch muss weitergehend untersucht werden, ob stark immunsupprimierte Patienten wie Patienten nach alloSZT eine geeignete Zielgruppe für T-Zell-Tests sind oder ob T-Zell-Assays primär bei weniger oder nicht immunsupprimierten Patienten eingesetzt werden sollten.

iv) Die mangelnde **Standardisierung** der T-Zell-Assays ist eine weitere Herausforderung. So müssten z. B. für jeden Assay in zukünftigen Studien folgende Fragen der Ergebnisinterpretation beantwortet werden:

- Soll ein positives spezifisches Testergebnis trotz einer negativen Positivkontrolle als positives Testergebnis anerkannt werden?
- Soll es einen Grenzwert für die Hintergrundkontrolle geben, der ein ungültiges Testergebnis nach sich zieht?
- Soll der Hintergrund vom spezifischen Testergebnis subtrahiert werden, ein Quotient gebildet werden oder keine Verrechnung der Hintergrundkontrolle erfolgen?

Unserer Erfahrung nach sollte ein positives spezifisches Testergebnis trotz einer negativen Positivkontrolle als positives Testergebnis anerkannt werden. Ein positives spezifisches Testergebnis zeigt die Fähigkeit des Immunsystems, auf einen Stimulus zu antworten, und übernimmt daher die Aufgabe der Positivkontrolle. Ein negatives spezifisches Testergebnis mit negativer Positivkontrolle sollte hingegen als nicht auswertbarer Test betrachtet werden. Bei Überschreitungen von Hintergrundgrenzwerten sollte das Testergebnis ebenfalls als nicht valide erklärt und der Assay, falls möglich, mit einer neuen Blutprobe wiederholt werden. Als Alternative zum harten Grenzwert könnte jedoch auch das Verhältnis von Hintergrundkontrolle zur spezifischen Probe als Kriterium verwendet werden, wie dies bei kommerziellen Tests teilweise gehandhabt wird. Außerdem ist unsere Empfehlung den unspezifischen Hintergrund grundsätzlich vom Ergebnis der spezifischen Probe zu subtrahieren.

Diese Richtlinien für die Ergebnisinterpretation in Kombination mit klar definierten akzeptablen Zeiträumen für die präanalytische Lagerzeit und eine Standardisierung der Kryokonservierung würden die Vergleichbarkeit der T-Zell-Studien stark verbessern und sind die Grundlage für Multi-Center-Studien. Die von uns erarbeiteten und im vorherigen Absatz diskutierten Empfehlungen zur Ergebnisinterpretation sowie die zulässige maximale Lagerzeit von 8 Std. sollten eine gute Grundlage für die weitere klinische Validierung des VB-ELISAs sein.

Auch die einzelnen Publikationen dieser kumulativen Dissertation haben ihre Limitationen. In der Publikation „*Susceptibility of A. fumigatus-specific T-cell assays to pre-analytic blood storage and PBMC cryopreservation greatly depends on readout platform and analytes*“ (**Kapitel 3.1**) vergleichen wir den Einfluss von präanalytischer Lagerzeit und Kryokonservierung auf *A. fumigatus*-spezifische T-Zellen. Die Publikation hat eine relativ kleine, gesunde Spenderkohorte. Auf Grund der geringen Inzidenz von *Aspergillus*-assoziierten Erkrankungen an unserem Zentrum konnten keine zusätzlichen Patientenproben inkludiert werden. Patientenproben können weitere Herausforderungen wie z. B. die in Punkt iii) beschriebene Immunsuppression mit sich bringen und wären daher die am besten geeignete Kohorte. Des Weiteren haben wir insgesamt drei Kryokonservierungsprotokolle evaluiert. Durch die große Anzahl von Kryokonservierungsprotokollen ist es, wie bereits besprochen, möglich, dass ein anderes

Kryokonservierungsprotokoll bessere Ergebnisse erzielen würde. Ebenfalls wurde der Einfluss von präanalytischer Lagerzeit und Kryokonservierung nur mit *A. fumigatus*-Lysat getestet. Weniger komplexe Antigene könnten potenziell bessere Ergebnisse erzielen und sollten in Folgestudien evaluiert werden. Limitationen der anderen in diese Dissertation inkludierten Publikationen können in den jeweiligen Diskussionen gefunden werden (**Kapitel 3.2, Kapitel 3.3, Kapitel 3.4**).

4.8 Potenzieller Nutzen von funktionellen T-Zell-Assays als surrogative Marker in der Diagnose von Schimmelpilz-assoziierten Krankheiten

Wie in **Kapitel 1.2** beschrieben, ist es eine große Herausforderung, *A. fumigatus*-assoziierte Krankheiten zu diagnostizieren. Für die unterschiedlichen Krankheitsformen ist die Diagnose via Patientenhistorie, Grunderkrankung, Patientenimmunistatus, typischen Symptomen und die Interpretation einer Reihe von diagnostischen Tests notwendig. Einzelne diagnostische Tests sind nicht leistungsstark genug, um *A. fumigatus*-assoziierte Krankheiten zu erkennen [8, 13]. Die aktuellen Tests weisen *A. fumigatus* direkt nach und sind nur singular positiv (Kultur, GM und PCR-Test) oder bleiben für eine lange Zeit positiv (CT-Scan) [13, 227, 228]. Die Vielzahl der zu berücksichtigenden Faktoren sowie die Unzuverlässigkeit und Schwächen der einzelnen diagnostischen Tests führen zu späten oder falschen Diagnosen, die durch eine verzögerte oder inkorrekte Therapie zu einer erhöhten Mortalität und verstärkter Symptomatik führen [13, 34, 51]. Des Weiteren ist das Monitoring der antimykotischen Prophylaxe oder Therapie mit den aktuellen diagnostischen Tests nicht möglich.

Antimykotika werden entweder prophylaktisch bei Hochrisikopatienten oder zur Therapie diagnostizierter mykologischer Erkrankungen verabreicht. Die Diagnose der IA wird durch die in vielen Krankenhäusern verabreichte antimykotische Prophylaxe erschwert, da unter anderem der GM-Test durch die Prophylaxe stark an Sensitivität verliert. Durchbruchinfektionen sind daher schwer zu diagnostizieren [21]. Antimykotika sind mit diversen Nebenwirkungen wie

Hepatotoxizität, Entzündungen und Karzinomen assoziiert [13, 314-316]. Daher sind Indikatoren notwendig, die personalisiert den *A. fumigatus*-Immunstatus überprüfen. Als Konsequenz könnte die antimykotische Prophylaxe/Therapie bei geschützten Patienten früher abgesetzt werden, was die Zeit und den Grad der Nebenwirkungen senken würde. Im Gegensatz dazu könnte die Therapie bei ungeschützten Patienten fortgesetzt werden.

Neben der offensichtlichen Verbesserung der Patientenversorgung hätte eine verbesserte Diagnostik auch einen starken sozioökonomischen Nutzen. Die IA ist die teuerste Pilzinfektion [317]. Die Kosten einer IA werden pro Patient im Durchschnitt auf 76.235 \$ geschätzt. Diese Zahl setzt sich unter anderem zusammen aus einem verlängerten Krankenhausaufenthalt von durchschnittlich 30 - 35 Tagen und einem antimykotischen Therapiezeitraum von 115 Tagen [318, 319]. Ein großer Kostenfaktor ist die Antimykotikaverabreichung, die bei einer mit Voriconazol behandelten IA durchschnittlich mit 11.996 € und bei Caspofungin mit 13.657 € veranschlagt wird [320]. Am häufigsten wird Voriconazol verabreicht, aber auch die Kombination von Voriconazol und Caspofungin wird frequent benutzt [318]. Diese Daten zeigen den enormen sozioökonomischen Wert, den die Entwicklung eines diagnostischen Tests, der die gezielte, individuelle Prophylaxe- und Therapiesteuerung von Antimykotika ermöglicht, bietet. Die Firma Lophius Bioscience geht bei einem zu ihrem T-Track.CMV-ELISPOT vergleichbaren T-Zell-Assay von einem Testpreis von 60 € aus [321]. Sowohl im Hinblick auf diese sozioökonomischen Vorteile und die Verbesserung der Patientenversorgung wäre die Entwicklung von T-Zell-Assays für *A. fumigatus* wertvoll.

Ein solcher diagnostischer Test für *A. fumigatus* hätte potenziell große Vorteile gegenüber der aktuellen Diagnostik. Der Test könnte im breiten Spektrum der *A. fumigatus*-assoziierten Krankheiten von der IA bis zu den Hypersensitivitätskrankheiten eingesetzt werden. Er könnte als neuartiger Surrogatmarker frühere Diagnosen ermöglichen und die Krankheiten sensitiver und spezifischer aufspüren. T-Zell-Assays können zur personalisierten Risikostratifizierung genutzt werden. Hier würde eine frühe Identifizierung von Hochrisikopatienten eine gezielte Prophylaxe ermöglichen. Die Performance von T-Zell-Assays wird höchstwahrscheinlich im Gegensatz zu dem GM-Test nicht von der antimykotischen Prophylaxe beeinflusst [21, 221]. Auch

die Therapiesteuerung von bereits diagnostizierten *A. fumigatus*-assoziierten Krankheiten würde ein solcher Test ermöglichen. Zudem könnten Prophylaxe und Therapiezeiträume Evidenzbasiert neu festgelegt werden. Der VB-ELISA ist hierfür in unseren Augen der vielversprechendste T-Zell-Assay.

4.9 Perspektiven für die klinische Anwendung des VB-ELISA-Konzepts in der klinischen Mykologie

Die Identifikation von geeigneten Antigenen ist, wie in **Kapitel 4.6** bereits erwähnt, ein grundlegender Schritt zum klinischen Einsatz des VB-ELISAs für *Aspergillus*-assoziierte Krankheiten. Proteinantigene haben entscheidende Vorteile gegenüber dem Einsatz von Lysaten (siehe **Kapitel 4.6**). Obwohl wir AspF22, CatB und CipC als potenzielle Proteinantigene für Studien im arbeitsmedizinischen Kontext identifizieren konnten, müsste ein *Screening* einer großen Anzahl von *A. fumigatus*-Antigenen in verschiedenen *A. fumigatus*-assoziierten Krankheitsbildern, inklusive der IA, erfolgen. Dadurch würden weitere Antigene für einen T-Zell-Test identifiziert und die Stimuli könnten potenziell an die konkrete Fragestellung angepasst werden. Im Fall der IA sind z. B. Antigene, die dem Immunsystem erst nach der Auskeimung des Schimmelpilzes präsentiert werden, vielversprechende Kandidaten, um eine Kolonisation der Lunge von einer IA zu unterscheiden. Des Weiteren muss der Produktionsprozess der Antigene weiter verbessert werden. Unspezifische Aktivierungen des Stimulationssystems durch Endotoxinverunreinigungen und Unterschiede in der Stimulationsfähigkeit desselben Proteins aus verschiedenen Herstellungszyklen sollten durch einen industriellen Herstellungsprozess und Qualitätskontrollen umgangen werden.

Das Ziel der Entwicklung und Validierung des VB-ELISA ist der Einsatz in einem möglichst weiten Spektrum der *Aspergillus*-assoziierten Krankheitsbilder. Nach der Identifikation und Validierung der neuen Proteinantigene mit der Hilfe von Patientenproben sollte der VB-ELISA daher in klar definierten Patientenkohorten multizentrisch evaluiert werden. Der Fokus sollte

hierbei zunächst auf die CPA und ABPA gelegt werden, da Patienten mit diesen Krankheitsbildern (anders als IA-Patienten) in den meisten Fällen eine funktionale T-Zell-Antwort, die in unserem System zuverlässig gemessen werden kann, besitzen.

Weitere potenzielle Anwendungsfelder über die Diagnose und Verlaufsbeobachtung *A. fumigatus*-assoziierter Erkrankungen hinaus sind die Umweltmedizin, alternative Zielpathogene, *in vitro* Toxizitätstests, die Bestimmungen der Immunantworten auf Vakzinierungen und Immuntherapie, *in vivo* Experimente und die Kombination diverser Analysetechniken aus demselben Stimulationsröhrchen des VB-ELISAs.

In der **Umweltmedizin** könnten mit dem Assay nach Umweltkatastrophen mit Überschwemmungen, wie z. B. Hurrikans oder Hochwassern, die Auswirkungen von erhöhter Feuchtigkeit in der Wohnumgebung, die zu einer gesteigerten Pilzbelastung führt, auf das Immunsystem untersucht werden [322]. Feuchtigkeit und Schimmel im direkten Wohnumfeld erhöhen bei atopischen Personen das Risiko einer klinisch manifestierten Erkrankung [323, 324]. Welchen Einfluss die Höhe der Pilzbelastung auf die Gesundheit der Bewohner hat, ist jedoch auf Grund von fehlenden diagnostischen Tests nur schwer einzuschätzen [323, 324]. Unser Assay könnte um weitere allergologisch relevante Schimmelpilzstimuli (z. B. *Alternaria alternata*) erweitert werden, um so den Einfluss der Schimmelpilzbelastung auf das Immunsystem sowie die Gesundheit der Bewohner zu eruieren.

Neben Schimmelpilzen kann der VB-ELISA auch mit Stimuli von **alternativen Pathogenen** genutzt werden. Eine *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2* (SARS-CoV-2)-Infektion kann in *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19)-Patienten zu einer sekundären invasiven Pilzinfektion mit erhöhter Mortalität führen [325, 326]. In einem Forschungsprojekt unserer Arbeitsgruppe wird der VB-ELISA mit Stimuli für die Schimmelpilze *A. fumigatus* und *R. arrhizus* aus der Gattung der Mucorales sowie mit Protein S von SARS-CoV-2 erfolgreich eingesetzt. In dieser Studie wurde untersucht, mit welchen Immunmodulationen COVID-19 sekundäre Pilzinfektionen mit hoher Mortalität und Morbidität befördert [327]. Der Einsatz bei SARS-CoV-2-Infektionen in Kombination mit dem in den vorigen Kapiteln beschriebenen erfolgreichen Einsatz im Bereich der HCMV-Reaktivierungen zeigt die vielfältigen

Einsatzmöglichkeiten des VB-ELISA über die medizinische Mykologie hinaus [230]. Weiterhin führt unserer Arbeitsgruppe eine Pilotstudie durch, welche die SARS-CoV-2 Immunantwort von alloSZT-Patienten vor und nach der SARS-CoV-2-Vakzinierung untersucht. Bei Erfolg soll der Assay weiter auf seine Eignung für die Evaluation von **T-Zell-Antworten auf Vakzinierungen** untersucht werden. Das VB-ELISA-System könnte sich ebenfalls dafür eignen **Immuntherapien** zu überwachen oder erste *in vitro* **Toxizitätstests** durchzuführen.

Ein weiteres sinnvolles Einsatzgebiet des VB-ELISA sind *in vivo* **Experimente**. Es werden z. B. vermehrt experimentelle Immuntherapien wie Checkpoint-Inhibitoren für die Bekämpfung von Pilzinfektionen in Mausmodellen getestet [328-330]. Bei Mäusen ist das Blutvolumen jedoch stark begrenzt. Auf Grund des geringen Blutvolumens ist die PBMC-Isolation nicht praktikabel und in den meisten Fällen werden Milzzellen zur Analyse der T-Zell-Antwort genutzt. Milzzellen sind jedoch nur bedingt repräsentativ für das zirkulatorische System [331]. Durch die Evaluation des VB-ELISAs für Mausmodelle und eine Reduzierung des benötigten Blutvolumens könnten adaptive Immunantworten in murinen Modellen in einem physiologischeren Umfeld quantifiziert werden. Das benötigte Blutvolumen wurde für die beschriebene VB-basierte Durchflusszytometrie von Page und Kollegen in ersten Folgestudien bereits erfolgreich halbiert. Hierbei wurden exzellente Korrelationen zum ursprünglichen Blutvolumen festgestellt [332].

Eine **Kombination diverser Analysetechniken aus demselben Stimulationsröhrchen** sollte ebenfalls im VB-ELISA durchführbar sein. Die durchflusszytometrische Analyse von Zellen aus den Pellets in den Stimulationsröhrchen des VB-ELISA-Systems wurde bereits in dieser Arbeit erfolgreich durchgeführt [246]. Weiterhin wurde eine leicht abgeänderte Version des Systems von uns bereits für die Detektion *Aspergillus*-spezifischer T-Zellen via Durchflusszytometrie validiert [174]. Zusätzlich könnte das VB-ELISA-System für Genom- oder Transkriptomanalysen verwendet werden. Die Isolation von RNA und DNA aus den Stimulationsröhrchen sollte auf Grund der vielen verfügbaren RNA- und DNA-Isolationskits für VB leicht zu etablieren sein. Erste Daten wurden hierzu bereits in unpublizierten Pilotstudien generiert.

4.10 Konklusion

Lange präanalytische Lagerzeiten und Kryokonservierung beeinflussen die Testergebnisse von PBMC-basierten T-Zell-Assays für *A. fumigatus* negativ. Daher sind die aktuell verfügbaren T-Zell-Assays nicht für die Klinik geeignet und die Entwicklung eines neuen Assays ist für den klinischen Einsatz notwendig. Der in dieser Arbeit entwickelte VB-ELISA mit dualer Kostimulation verbessert die klinische Anwendbarkeit von T-Zell-Assays für *Aspergillus*-assoziierte Krankheitsbilder deutlich. Er ist gekennzeichnet durch hohe Reproduzierbarkeit und eine validierte präanalytische Lagerzeit von bis zu 8 Std.. Zudem müssen die Zellen, selbst bei großen Studien, auf Grund der Einfachheit und des minimalen Aufwands des Assays vor Ort nicht kryokonserviert oder versandt werden. Die Kryokonservierung des im VB-ELISA generierten Plasmas kann ohne Einfluss auf die Ergebnisse durchgeführt werden und ermöglicht Batch-Analysen.

Erste Ergebnisse zeigten das enorme Potenzial des Assays im breiten Spektrum der *Aspergillus*-assoziierten Krankheitsbilder. Für *Aspergillus*-assoziierte Hypersensitivitätskrankheitsbilder wurden in einer Pilotstudie mit dem VB-ELISA große Differenzen in der Sekretion der Th1-, Th2- und Th17-Zytokine von Patienten mit *A. fumigatus*-assoziierten Lungenerkrankungen gegenüber Kontrollpatienten aufgezeigt. Zudem wurden bei gesunden, beruflich *A. fumigatus*-exponierten Landarbeitern mit Hilfe des VB-ELISA große Unterschiede in der Sekretion sowohl von T-Zell-Zytokinen als auch von Zytokinen des innate Immunsystems, die an der Th-Zell-Polarisierung beteiligt sind, gegenüber Kontrollprobanden festgestellt. Berufliche, hohe Schimmelpilzexposition zeigte sich in unserer Studie in einer balancierten Erhöhung von Th1- und Th2-Zytokinen nach *in vitro* Exposition, während Th17-Zytokine nur bei Patienten mit *A. fumigatus*-assoziierten Lungenerkrankungen erhöht waren. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass bei der Entstehung von *A. fumigatus*-assoziierten Hypersensitivitätskrankheiten eine dysregulierte Th17-Antwort eine entscheidende Rolle spielt. IL-17 ist daher ein wichtiges Zytokin, das in der Evaluation des VB-ELISAs für *Aspergillus*-assoziierte Hypersensitivitätskrankheitsbilder besonderes genau evaluiert werden sollte.

Der VB-ELISA ist ebenfalls bei immunkompromittierten alloSZT-Patienten, die ein hohes Risiko für invasive Mykosen besitzen, durchführbar. Auch in dieser Gruppe konnte der VB-ELISA ab 800 Lymphozyten/ μ L im Patientenblut robuste Ergebnisse erzielen. Während in unserer monozentrischen Pilotstudie aufgrund der geringen Inzidenz keine Evaluation an IA-Patienten erfolgen konnte, wurde mittels VB-ELISA eine hohe Konkordanz der HCMV-spezifischen T-Zell-Antwort mit der HCMV-Serologie festgestellt.

In der Zukunft sollten Proteinantigene für den VB-ELISA für diverse *Aspergillus*-assoziierte Krankheitsbilder mit Patientenmaterial evaluiert werden. Die *A. fumigatus*-Antigene AspF22, CatB und CipC wurden von uns bereits als vielversprechende Antigene für die Arbeitsmedizin identifiziert [298] [siehe Doktorarbeit von Sonja Etter]. Nach systematischer Evaluation eines Antigenpektrums für verschiedene *Aspergillus*-assoziierte Krankheitsbilder sollte der VB-ELISA multizentrisch an großen Patientenkohorten validiert werden.

Basierend auf den vorläufigen Daten der auf dieser Arbeit aufbauenden initiierten Folgestudien ist des Weiteren davon auszugehen, dass der VB-ELISA mit seinen Stärken potenziell für eine Vielzahl von Anwendungsgebieten und Pathogenen universell eingesetzt werden kann. Neben der Immundiagnostik für diverse Pathogene kann der Assay für T-Zell-Antworten auf Vakzinierungen und Immuntherapien, *in vivo* Experimente und *in vitro* Toxizitätstests eingesetzt werden.

4.11 Disclaimer (Haftungsausschluss)

Die ELISPOT-Platten wurden von der Firma Lophius Biosciences (Mittragssteller) im Rahmen der Finanzierung Fördermittelnummer: BayBIO-1606-003, "*T-cell based diagnostic monitoring of invasive aspergillosis in hematological patients*" zur Verfügung gestellt.

4.12 Dankwort

Zuallerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Löffler für seine stetige Unterstützung danken. Lieber Jürgen, dein mykologisches Wissen und deine langjährige Erfahrung in der Planung naturwissenschaftlicher Doktorarbeiten sowie dein exzellentes wissenschaftliches Netzwerk haben den Erfolg dieser Arbeit ermöglicht. Danke, dass du immer an meiner Seite gestanden hast. Auch möchte ich mich bei den Mitgliedern meines Thesiskomitee, PD Dr. Niklas Beyersdorf und Prof. Dr. Michael Hudecek, für ihren *Input* und ihre Betreuung bedanken. Ich möchte besonders Prof. Dr. Sebastian Wurster danken. Du bist einer der brilliantesten Menschen, die ich in meinem Leben getroffen habe. Ohne deinen *Input* wäre meine Dissertation in dieser Form und Qualität nicht möglich gewesen. Ich bin froh dich meinen Mentor und Freund nennen zu dürfen. Unser engstes Team wäre nicht ohne Dr. Lukas Page komplett gewesen. Dein Einsatz und dein Wissen waren ebenfalls von größtem Wert für meine Dissertation und ich danke dir für die freundschaftliche Zusammenarbeit. Dank gilt natürlich dem gesamten Laborpersonal der AG Löffler und der AG Ullmann für viele lehrreiche und lustige Stunden sowie für die stetige Unterstützung. Des Weiteren danke ich Dr. Lewis White der unter großem persönlichem Einsatz die Patientenaquise in Cardiff ermöglicht hat. Zusätzlich danke ich der Firma Lophius (jetzt Mikrogen), insbesondere Dr. Ludwig Deml, die das Projekt mitgestaltet hat. Ebenfalls wichtig für das Projekt waren Prof. Dr. Frank Ebel und Dr. Elisabeth Schnack, die uns mit ihrer Expertise in der Herstellung von Antigenen geholfen haben.

Ich möchte ebenfalls meiner Familie danken, die mich in allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit unerschütterlich unterstützt haben. Ihr seid die Säulen meines Lebens. Besonders meiner Mutter

möchte ich für ihre Kommentare zu meiner Dissertation danken. Du bist immer für mich da und hast einen riesigen, positiven Einfluss auf mein Leben. Dafür danke ich dir herzlich. Auch meinem persönlichen Umfeld möchte ich meinen Dank aussprechen. Meine in Würzburg gewonnen Freundschaften haben mir die Kraft und das Durchhaltevermögen gegeben, die Dissertation so erfolgreich abzuschließen. Herausstellen möchte ich hier Achim, Julia, David, Melissa, Sascha, Tina, Grit, Patrick, Carsten, Karin, Harald und Romina. Wir hatten / haben eine großartige Zeit und ich möchte keinen von euch missen. Eine Person, die meinen Weg besonders intensiv mitverfolgt hat, ist Svenja. Auch dir möchte ich für unsere tolle gemeinsame Zeit und deine Unterstützung danken. Ich wünsche dir nur das Beste für deine Zukunft. Zuallerletzt möchte ich meiner Patnerin Beeke danken. Deine unterstützende, liebende Art und unser blindes Verständnis füreinander möchte ich nicht mehr missen. Unser stetiger (wissenschaftlicher) Austausch ist eine große Bereicherung.

5 Referenzen

1. van de Veerdonk, F.L., et al., *Aspergillus fumigatus morphology and dynamic host interactions*. Nat Rev Microbiol, 2017. **15**(11): p. 661-674.
2. Tekaiia, F. and J.P. Latge, *Aspergillus fumigatus: saprophyte or pathogen?* Curr Opin Microbiol, 2005. **8**(4): p. 385-92.
3. Latge, J.P., *Aspergillus fumigatus and aspergillosis*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(2): p. 310-50.
4. Debeaupuis, J.P., et al., *Genetic diversity among clinical and environmental isolates of Aspergillus fumigatus*. Infect Immun, 1997. **65**(8): p. 3080-5.
5. O'Gorman, C.M., H. Fuller, and P.S. Dyer, *Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen Aspergillus fumigatus*. Nature, 2009. **457**(7228): p. 471-4.
6. Beauvais, A., et al., *An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of Aspergillus fumigatus*. Cell Microbiol, 2007. **9**(6): p. 1588-600.
7. Abdel Hameed, A.A., I.H. Yasser, and I.M. Khoder, *Indoor air quality during renovation actions: a case study*. J Environ Monit, 2004. **6**(9): p. 740-4.
8. Latge, J.P. and G. Chamilos, *Aspergillus fumigatus and Aspergillosis in 2019*. Clin Microbiol Rev, 2019. **33**(1).
9. Schauwvlieghe, A., et al., *Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study*. Lancet Respir Med, 2018. **6**(10): p. 782-792.
10. van de Veerdonk, F.L., et al., *Influenza-Associated Aspergillosis in Critically Ill Patients*. Am J Respir Crit Care Med, 2017. **196**(4): p. 524-527.
11. Salmanton-García, J., et al., *COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis, March-August 2020*. Emerg Infect Dis, 2021. **27**(4): p. 1077-1086.
12. Vallabhaneni, S., et al., *Trends in Hospitalizations Related to Invasive Aspergillosis and Mucormycosis in the United States, 2000-2013*. Open Forum Infect Dis, 2017. **4**(1): p. ofw268.
13. Ullmann, A.J., et al., *Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline*. Clin Microbiol Infect, 2018. **24 Suppl 1**: p. e1-e38.
14. Gerson, S.L., et al., *Invasive pulmonary aspergillosis in adult acute leukemia: clinical clues to its diagnosis*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 1985. **3**(8): p. 1109-1116.
15. Kuhlman, J.E., E.K. Fishman, and S.S. Siegelman, *Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukemia: characteristic findings on CT, the CT halo sign, and the role of CT in early diagnosis*. Radiology, 1985. **157**(3): p. 611-614.
16. Huang, L., et al., *Values of radiological examinations for the diagnosis and prognosis of invasive bronchial-pulmonary aspergillosis in critically ill patients with chronic obstructive pulmonary diseases*. The Clinical Respiratory Journal, 2018. **12**(2): p. 499-509.
17. Thornton, C.R., *Molecular Imaging of Invasive Pulmonary Aspergillosis Using ImmunoPET/MRI: The Future Looks Bright*. Frontiers in Microbiology, 2018. **9**.
18. Röchel, R. and M. Schaffrinski, *Versatile fluorescent staining of fungi in clinical specimens by using the optical brightener Blankophor*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(8): p. 2694-6.

19. Miceli, M.H. and J. Maertens, *Role of Non-Culture-Based Tests, with an Emphasis on Galactomannan Testing for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis*. *Semin Respir Crit Care Med*, 2015. **36**(5): p. 650-61.
20. Lehnbecher, T., et al., *Diagnostic Approaches for Invasive Aspergillosis—Specific Considerations in the Pediatric Population*. *Frontiers in Microbiology*, 2018. **9**(518).
21. Lewis, R.E., M. Giannella, and P. Viale, *Serum galactomannan diagnosis of breakthrough invasive fungal disease*. *Clin Infect Dis*, 2015. **60**(8): p. 1284.
22. Lamoth, F., *Galactomannan and 1,3-β-d-Glucan Testing for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis*. *Journal of Fungi*, 2016. **2**(3): p. 22.
23. Marchetti, O., et al., *ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients*. *Bone Marrow Transplantation*, 2012. **47**(6): p. 846-854.
24. Barnes, R.A., et al., *Diagnosis of aspergillosis by PCR: Clinical considerations and technical tips*. *Medical Mycology*, 2018. **56**(suppl_1): p. S60-S72.
25. Arvanitis, M., T. Anagnostou, and E. Mylonakis, *Galactomannan and Polymerase Chain Reaction–Based Screening for Invasive Aspergillosis Among High-Risk Hematology Patients: A Diagnostic Meta-analysis*. *Clinical Infectious Diseases*, 2015. **61**(8): p. 1263-1272.
26. White, P.L., et al., *Aspergillus Polymerase Chain Reaction: Systematic Review of Evidence for Clinical Use in Comparison With Antigen Testing*. *Clinical Infectious Diseases*, 2015. **61**(8): p. 1293-1303.
27. Donnelly, J.P., et al., *Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium*. *Clinical Infectious Diseases*, 2019. **71**(6): p. 1367-1376.
28. Groll, A.H., et al., *Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital*. *J Infect*, 1996. **33**(1): p. 23-32.
29. Chamilos, G., et al., *Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003)*. *Haematologica*, 2006. **91**(7): p. 986-9.
30. Lehnbecher, T., et al., *Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital*. *J Infect*, 2010. **61**(3): p. 259-65.
31. Kontoyiannis, D.P., et al., *Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2010. **50**(8): p. 1091-1100.
32. Webb, B.J., et al., *Epidemiology and Clinical Features of Invasive Fungal Infection in a US Health Care Network*. *Open Forum Infect Dis*, 2018. **5**(8): p. ofy187.
33. Nucci, M., et al., *Early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in hematologic patients: an opportunity to improve the outcome*. *Haematologica*, 2013. **98**(11): p. 1657-1660.
34. Denning, D.W., et al., *Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management*. *Eur Respir J*, 2016. **47**(1): p. 45-68.
35. Denning, D.W. and D.S. Perlin, *Azole resistance in Aspergillus: a growing public health menace*. *Future Microbiol*, 2011. **6**(11): p. 1229-32.

36. Denning, D.W., A. Pleuvry, and D.C. Cole, *Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults*. *Med Mycol*, 2013. **51**(4): p. 361-70.
37. Denning, D.W., A. Pleuvry, and D.C. Cole, *Global burden of chronic pulmonary aspergillosis complicating sarcoidosis*. *Eur Respir J*, 2013. **41**(3): p. 621-6.
38. Kosmidis, C. and D.W. Denning, *The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis*. *Thorax*, 2015. **70**(3): p. 270-7.
39. Smith, N.L. and D.W. Denning, *Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma*. *Eur Respir J*, 2011. **37**(4): p. 865-72.
40. Alastruey-Izquierdo, A., et al., *Treatment of Chronic Pulmonary Aspergillosis: Current Standards and Future Perspectives*. *Respiration*, 2018. **96**(2): p. 159-170.
41. Denning, D.W., et al., *Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review*. *Clin Infect Dis*, 2003. **37** **Suppl 3**: p. S265-80.
42. Patterson, T.F., et al., *Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America*. *Clin Infect Dis*, 2016. **63**(4): p. e1-e60.
43. Camuset, J., et al., *Treatment of chronic pulmonary aspergillosis by voriconazole in nonimmunocompromised patients*. *Chest*, 2007. **131**(5): p. 1435-41.
44. Nam, H.S., et al., *Clinical characteristics and treatment outcomes of chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: a review of 43 cases*. *Int J Infect Dis*, 2010. **14**(6): p. e479-82.
45. Kono, Y., et al., *The utility of galactomannan antigen in the bronchial washing and serum for diagnosing pulmonary aspergillosis*. *Respir Med*, 2013. **107**(7): p. 1094-100.
46. Izumikawa, K., et al., *Bronchoalveolar lavage galactomannan for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis*. *Med Mycol*, 2012. **50**(8): p. 811-7.
47. Shin, B., et al., *Serum galactomannan antigen test for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis*. *J Infect*, 2014. **68**(5): p. 494-9.
48. Uffredi, M.L., et al., *Significance of Aspergillus fumigatus isolation from respiratory specimens of nongranulocytopenic patients*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2003. **22**(8): p. 457-62.
49. Patel, A.R., et al., *Diagnosing Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: A Review*. *Cureus*, 2019. **11**(4): p. e4550.
50. Stevens, D.A., et al., *Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Cystic Fibrosis—State of the Art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference*. *Clinical Infectious Diseases*, 2003. **37**(Supplement_3): p. S225-S264.
51. Agarwal, R., et al., *Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria*. *Clin Exp Allergy*, 2013. **43**(8): p. 850-73.
52. Agarwal, R., *Allergic bronchopulmonary aspergillosis: Lessons for the busy radiologist*. *World journal of radiology*, 2011. **3**(7): p. 178-181.
53. Reiff, D.B., et al., *CT findings in bronchiectasis: limited value in distinguishing between idiopathic and specific types*. *AJR Am J Roentgenol*, 1995. **165**(2): p. 261-7.
54. Agarwal, R., et al., *Diagnostic Performance of Various Tests and Criteria Employed in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: A Latent Class Analysis*. *PLOS ONE*, 2013. **8**(4): p. e61105.
55. Agarwal, R., et al., *Aspergillus hypersensitivity and allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma: systematic review and meta-analysis*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009. **13**(8): p. 936-44.

56. Denning, D.W., *Chronic forms of pulmonary aspergillosis*. Clin Microbiol Infect, 2001. **7 Suppl 2**: p. 25-31.
57. McCarthy, D.S. and J. Pepys, *Allergic broncho-pulmonary aspergillosis. Clinical immunology. 2. Skin, nasal and bronchial tests*. Clin Allergy, 1971. **1**(4): p. 415-32.
58. Chakrabarti, A., et al., *Eight-year study of allergic bronchopulmonary aspergillosis in an Indian teaching hospital*. Mycoses, 2002. **45**(8): p. 295-9.
59. Kirsten, D., et al., [*Diagnosis of bronchopulmonary aspergillosis is often made too late*]. Med Klin (Munich), 1993. **88**(6): p. 353-6.
60. Sabino, R., et al., *The role of occupational Aspergillus exposure in the development of diseases*. Med Mycol, 2019. **57**(Supplement_2): p. S196-s205.
61. Kotimaa, M.H., et al., *Airborne molds and actinomycetes in the work environment of farmer's lung patients in Finland*. Scand J Work Environ Health, 1984. **10**(2): p. 115-9.
62. Liu, S., et al., *Prevalence and risk factors for farmer's lung in greenhouse farmers: an epidemiological study of 5,880 farmers from Northeast China*. Cell Biochem Biophys, 2015. **71**(2): p. 1051-7.
63. Halpin, D.M., et al., *Extrinsic allergic alveolitis and asthma in a sawmill worker: case report and review of the literature*. Occup Environ Med, 1994. **51**(3): p. 160-4.
64. Faerden, K., et al., *Hypersensitivity pneumonitis in a cluster of sawmill workers: a 10-year follow-up of exposure, symptoms, and lung function*. Int J Occup Environ Health, 2014. **20**(2): p. 167-73.
65. Bousquet, P.J., et al., *Assessment of allergen sensitization in a general population-based survey (European Community Respiratory Health Survey I)*. Ann Epidemiol, 2010. **20**(11): p. 797-803.
66. Bousquet, P.J., et al., *Geographical variation in the prevalence of positive skin tests to environmental aeroallergens in the European Community Respiratory Health Survey I*. Allergy, 2007. **62**(3): p. 301-9.
67. Baur, X., A. Fischer, and L.T. Budnik, *Spotlight on the diagnosis of extrinsic allergic alveolitis (hypersensitivity pneumonitis)*. J Occup Med Toxicol, 2015. **10**: p. 15.
68. Bush, R.K., et al., *The medical effects of mold exposure*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(2): p. 326-33.
69. Knowles, M.R. and R.C. Boucher, *Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways*. J Clin Invest, 2002. **109**(5): p. 571-7.
70. Wasylanka, J.A. and M.M. Moore, *Aspergillus fumigatus conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 8): p. 1579-87.
71. Aimanianda, V., et al., *Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1117-21.
72. Caffrey, A.K., et al., *IL-1alpha signaling is critical for leukocyte recruitment after pulmonary Aspergillus fumigatus challenge*. PLoS Pathog, 2015. **11**(1): p. e1004625.
73. Evans, S.E., et al., *Stimulated innate resistance of lung epithelium protects mice broadly against bacteria and fungi*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **42**(1): p. 40-50.
74. Westphalen, K., et al., *Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity*. Nature, 2014. **506**(7489): p. 503-6.
75. Balloy, V., et al., *Aspergillus fumigatus-induced interleukin-8 synthesis by respiratory epithelial cells is controlled by the phosphatidylinositol 3-kinase, p38 MAPK, and ERK1/2 pathways and not by the toll-like receptor-MyD88 pathway*. J Biol Chem, 2008. **283**(45): p. 30513-21.

76. Serrano-Gomez, D., et al., *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin mediates binding and internalization of Aspergillus fumigatus conidia by dendritic cells and macrophages*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5635-43.
77. Faro-Trindade, I., et al., *Characterisation of innate fungal recognition in the lung*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35675.
78. Garlanda, C., et al., *Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response*. Nature, 2002. **420**(6912): p. 182-6.
79. Gazendam, R.P., et al., *Human Neutrophils Use Different Mechanisms To Kill Aspergillus fumigatus Conidia and Hyphae: Evidence from Phagocyte Defects*. J Immunol, 2016. **196**(3): p. 1272-83.
80. Zarembek, K.A., et al., *Human polymorphonuclear leukocytes inhibit Aspergillus fumigatus conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion*. J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6367-73.
81. Tkalcevic, J., et al., *Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 201-10.
82. Jaillon, S., et al., *The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps*. J Exp Med, 2007. **204**(4): p. 793-804.
83. Guerra, E.S., et al., *Central Role of IL-23 and IL-17 Producing Eosinophils as Immunomodulatory Effector Cells in Acute Pulmonary Aspergillosis and Allergic Asthma*. PLoS Pathog, 2017. **13**(1): p. e1006175.
84. Lilly, L.M., et al., *Eosinophil deficiency compromises lung defense against Aspergillus fumigatus*. Infect Immun, 2014. **82**(3): p. 1315-25.
85. Ziegler, S., et al., *CD56 Is a Pathogen Recognition Receptor on Human Natural Killer Cells*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 6138.
86. Schmidt, S., et al., *Human natural killer cells exhibit direct activity against Aspergillus fumigatus hyphae, but not against resting conidia*. J Infect Dis, 2011. **203**(3): p. 430-5.
87. Bouzani, M., et al., *Human NK cells display important antifungal activity against Aspergillus fumigatus, which is directly mediated by IFN-gamma release*. J Immunol, 2011. **187**(3): p. 1369-76.
88. Weiss, E., et al., *First Insights in NK-DC Cross-Talk and the Importance of Soluble Factors During Infection With Aspergillus fumigatus*. Front Cell Infect Microbiol, 2018. **8**: p. 288.
89. Zhang, X., et al., *Aspergillus fumigatus enhances human NK cell activity by regulating M1 macrophage polarization*. Mol Med Rep, 2019. **20**(2): p. 1241-1249.
90. Stuehler, C., et al., *Immune Reconstitution After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Association With Occurrence and Outcome of Invasive Aspergillosis*. J Infect Dis, 2015. **212**(6): p. 959-67.
91. Loures, F.V., et al., *Recognition of Aspergillus fumigatus hyphae by human plasmacytoid dendritic cells is mediated by dectin-2 and results in formation of extracellular traps*. PLoS Pathog, 2015. **11**(2): p. e1004643.
92. Espinosa, V., et al., *Type III interferon is a critical regulator of innate antifungal immunity*. Sci Immunol, 2017. **2**(16).
93. Seyedmousavi, S., et al., *Exogenous Stimulation of Type I Interferon Protects Mice with Chronic Granulomatous Disease from Aspergillosis through Early Recruitment of Host-Protective Neutrophils into the Lung*. mBio, 2018. **9**(2).

94. Andrianaki, A.M., et al., *Author Correction: Iron restriction inside macrophages regulates pulmonary host defense against Rhizopus species*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 5015.
95. Hohl, T.M., et al., *Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection*. Cell Host Microbe, 2009. **6**(5): p. 470-81.
96. He, Q., et al., *Pentraxin 3 Gene Polymorphisms and Pulmonary Aspergillosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Patients*. Clin Infect Dis, 2018. **66**(2): p. 261-267.
97. Cunha, C., et al., *Genetic PTX3 deficiency and aspergillosis in stem-cell transplantation*. N Engl J Med, 2014. **370**(5): p. 421-32.
98. Fisher, C.E., et al., *Validation of single nucleotide polymorphisms in invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2017. **129**(19): p. 2693-2701.
99. Wojtowicz, A., et al., *PTX3 Polymorphisms and Invasive Mold Infections After Solid Organ Transplant*. Clin Infect Dis, 2015. **61**(4): p. 619-22.
100. Cunha, C., et al., *PTX3-Based Genetic Testing for Risk of Aspergillosis After Lung Transplant*. Clin Infect Dis, 2015. **61**(12): p. 1893-4.
101. Moalli, F., et al., *Role of complement and Fc{gamma} receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against Aspergillus fumigatus*. Blood, 2010. **116**(24): p. 5170-80.
102. Pennock, N.D., et al., *T cell responses: naive to memory and everything in between*. Adv Physiol Educ, 2013. **37**(4): p. 273-83.
103. LeBien, T.W. and T.F. Tedder, *B lymphocytes: how they develop and function*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1570-80.
104. Kumar, B.V., T.J. Connors, and D.L. Farber, *Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life*. Immunity, 2018. **48**(2): p. 202-213.
105. Mueller, D.L., *Mechanisms maintaining peripheral tolerance*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 21-7.
106. Chen, L. and D.B. Flies, *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(4): p. 227-42.
107. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
108. Udagawa, T., D.G. Woodside, and B.W. McIntyre, *Alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29) integrin costimulation of human T cells enhances transcription factor and cytokine induction in the absence of altered sensitivity to anti-CD3 stimulation*. J Immunol, 1996. **157**(5): p. 1965-72.
109. Sckisel, G.D., et al., *Out-of-Sequence Signal 3 Paralyzes Primary CD4(+) T-Cell-Dependent Immunity*. Immunity, 2015. **43**(2): p. 240-50.
110. Abbas, A., A. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology. 9th Edition. Page 225 - 231. Chapter 10. Differentiation and Functions of CD4+ Effector Cells*. 2016.
111. Abbas, A., A. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology. 9th Edition. Page 229. Figure 10.4 Properties of the major subsets of CD4+ helper T cells*. 2016.
112. Dewi, I., F. van de Veerdonk, and M. Gresnigt, *The Multifaceted Role of T-Helper Responses in Host Defense against Aspergillus fumigatus*. Journal of Fungi, 2017(4).
113. Bacher, P., et al., *Antigen-specific expansion of human regulatory T cells as a major tolerance mechanism against mucosal fungi*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(4): p. 916-28.
114. Jolink, H., et al., *Induction of A. fumigatus-specific CD4-positive T cells in patients recovering from invasive aspergillosis*. Haematologica, 2014. **99**(7): p. 1255-63.

115. Bedke, T., et al., *Distinct and complementary roles for Aspergillus fumigatus-specific Tr1 and Foxp3+ regulatory T cells in humans and mice*. Immunol Cell Biol, 2014. **92**(8): p. 659-70.
116. Oshero, N., *Interaction of the pathogenic mold Aspergillus fumigatus with lung epithelial cells*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 346.
117. Saenz, S.A., B.C. Taylor, and D. Artis, *Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites*. Immunol Rev, 2008. **226**: p. 172-90.
118. Mulligan, J.K., et al., *Human sinonasal epithelial cells direct dendritic function and T-cell T helper 1/T helper 2 skewing following Aspergillus exposure*. Int Forum Allergy Rhinol, 2011. **1**(4): p. 268-74.
119. de Luca, A., et al., *Non-hematopoietic cells contribute to protective tolerance to Aspergillus fumigatus via a TRIF pathway converging on IDO*. Cell Mol Immunol, 2010. **7**(6): p. 459-70.
120. Steele, C., et al., *The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of Aspergillus fumigatus*. PLoS Pathog, 2005. **1**(4): p. e42.
121. Gafa, V., et al., *In vitro infection of human dendritic cells by Aspergillus fumigatus conidia triggers the secretion of chemokines for neutrophil and Th1 lymphocyte recruitment*. Microbes Infect, 2007. **9**(8): p. 971-80.
122. Bozza, S., et al., *Dendritic cells transport conidia and hyphae of Aspergillus fumigatus from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1362-71.
123. Barrios, C.S., et al., *The costimulatory molecules CD80, CD86 and OX40L are up-regulated in Aspergillus fumigatus sensitized mice*. Clin Exp Immunol, 2005. **142**(2): p. 242-50.
124. Dewi, I.M.W., F.L. van de Veerdonk, and M.S. Gresnigt, *The Multifaceted Role of T-Helper Responses in Host Defense against Aspergillus fumigatus*. J Fungi (Basel), 2017. **3**(4).
125. Ramirez-Ortiz, Z.G. and T.K. Means, *The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi (A. fumigatus, C. neoformans and C. albicans)*. Virulence, 2012. **3**(7): p. 635-46.
126. Bernard, M. and J.P. Latge, *Aspergillus fumigatus cell wall: composition and biosynthesis*. Med Mycol, 2001. **39 Suppl 1**: p. 9-17.
127. Gafa, V., et al., *Human dendritic cells following Aspergillus fumigatus infection express the CCR7 receptor and a differential pattern of interleukin-12 (IL-12), IL-23, and IL-27 cytokines, which lead to a Th1 response*. Infect Immun, 2006. **74**(3): p. 1480-9.
128. Lothar, J., et al., *Human dendritic cell subsets display distinct interactions with the pathogenic mould Aspergillus fumigatus*. Int J Med Microbiol, 2014. **304**(8): p. 1160-8.
129. Santarlasci, V., et al., *IL-1 and T Helper Immune Responses*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 182.
130. Seder, R.A., et al., *The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice*. J Exp Med, 1992. **176**(4): p. 1091-8.
131. Hsieh, C.S., et al., *Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(13): p. 6065-9.
132. Fei, M., et al., *TNF-alpha from inflammatory dendritic cells (DCs) regulates lung IL-17A/IL-5 levels and neutrophilia versus eosinophilia during persistent fungal infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(13): p. 5360-5.

133. Chamilos, G., et al., *Generation of IL-23 producing dendritic cells (DCs) by airborne fungi regulates fungal pathogenicity via the induction of T(H)-17 responses*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12955.
134. Rivera, A., et al., *Dectin-1 diversifies Aspergillus fumigatus-specific T cell responses by inhibiting T helper type 1 CD4 T cell differentiation*. J Exp Med, 2011. **208**(2): p. 369-81.
135. Cenci, E., et al., *Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis*. J Infect Dis, 1998. **178**(6): p. 1750-60.
136. Cenci, E., et al., *Th1 and Th2 cytokines in mice with invasive aspergillosis*. Infect Immun, 1997. **65**(2): p. 564-70.
137. Romani, L., et al., *Thymosin alpha 1 activates dendritic cells for antifungal Th1 resistance through toll-like receptor signaling*. Blood, 2004. **103**(11): p. 4232-9.
138. Brieland, J.K., et al., *Cytokine networking in lungs of immunocompetent mice in response to inhaled Aspergillus fumigatus*. Infect Immun, 2001. **69**(3): p. 1554-60.
139. Damsker, J.M., A.M. Hansen, and R.R. Caspi, *Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1183**: p. 211-21.
140. Antachopoulos, C. and E. Roilides, *Cytokines and fungal infections*. Br J Haematol, 2005. **129**(5): p. 583-96.
141. Chai, L.Y., et al., *Anti-Aspergillus human host defence relies on type 1 T helper (Th1), rather than type 17 T helper (Th17), cellular immunity*. Immunology, 2010. **130**(1): p. 46-54.
142. Nagai, H., et al., *Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha protect mice from invasive aspergillosis*. J Infect Dis, 1995. **172**(6): p. 1554-60.
143. Moss, R.B., *Pathophysiology and immunology of allergic bronchopulmonary aspergillosis*. Med Mycol, 2005. **43 Suppl 1**: p. S203-6.
144. Deo, S.S., et al., *Role played by Th2 type cytokines in IgE mediated allergy and asthma*. Lung India, 2010. **27**(2): p. 66-71.
145. Cenci, E., et al., *Interleukin-4 causes susceptibility to invasive pulmonary aspergillosis through suppression of protective type I responses*. J Infect Dis, 1999. **180**(6): p. 1957-68.
146. Cenci, E., et al., *T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 381-8.
147. Radauer, C., et al., *Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences*. Allergy, 2014. **69**(4): p. 413-9.
148. Cramer, R., et al., *Fungi: the neglected allergenic sources*. Allergy, 2014. **69**(2): p. 176-85.
149. Simon-Nobbe, B., et al., *The spectrum of fungal allergy*. Int Arch Allergy Immunol, 2008. **145**(1): p. 58-86.
150. Cramer, R., *Structural aspects of fungal allergens*. Semin Immunopathol, 2015. **37**(2): p. 117-21.
151. Page, L., et al., *Evaluation of Aspergillus and Mucorales specific T-cells and peripheral blood mononuclear cell cytokine signatures as biomarkers of environmental mold exposure*. Int J Med Microbiol, 2018. **308**(8): p. 1018-1026.
152. Becker, K.L., et al., *Pattern recognition pathways leading to a Th2 cytokine bias in allergic bronchopulmonary aspergillosis patients*. Clin Exp Allergy, 2015. **45**(2): p. 423-37.
153. Kurup, V.P., et al., *IgE and eosinophil regulation in a murine model of allergic aspergillosis*. J Leukoc Biol, 1994. **56**(5): p. 593-8.

154. Bacher, P., et al., *Human Anti-fungal Th17 Immunity and Pathology Rely on Cross-Reactivity against Candida albicans*. Cell, 2019. **176**(6): p. 1340-1355.e15.
155. Werner, J.L., et al., *Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against Aspergillus fumigatus*. J Immunol, 2009. **182**(8): p. 4938-46.
156. Gessner, M.A., et al., *Dectin-1-dependent interleukin-22 contributes to early innate lung defense against Aspergillus fumigatus*. Infect Immun, 2012. **80**(1): p. 410-7.
157. Zelante, T., et al., *IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance*. Eur J Immunol, 2007. **37**(10): p. 2695-706.
158. Gresnigt, M.S., et al., *A polysaccharide virulence factor from Aspergillus fumigatus elicits anti-inflammatory effects through induction of Interleukin-1 receptor antagonist*. PLoS Pathog, 2014. **10**(3): p. e1003936.
159. Fontaine, T., et al., *Galactosaminogalactan, a new immunosuppressive polysaccharide of Aspergillus fumigatus*. PLoS Pathog, 2011. **7**(11): p. e1002372.
160. Delsing, C.E., et al., *Th17 cytokine deficiency in patients with Aspergillus skull base osteomyelitis*. BMC Infect Dis, 2015. **15**: p. 140.
161. Smeekens, S.P., et al., *Low interleukin-17A production in response to fungal pathogens in patients with chronic granulomatous disease*. J Interferon Cytokine Res, 2012. **32**(4): p. 159-68.
162. Zelante, T., et al., *IL-17/Th17 in anti-fungal immunity: what's new?* Eur J Immunol, 2009. **39**(3): p. 645-8.
163. Zelante, T., et al., *Th17 cells in the setting of Aspergillus infection and pathology*. Med Mycol, 2009. **47 Suppl 1**: p. S162-9.
164. Jolink, H., et al., *Pulmonary immune responses against Aspergillus fumigatus are characterized by high frequencies of IL-17 producing T-cells*. J Infect, 2017. **74**(1): p. 81-88.
165. Armstrong-James, D.P., et al., *Impaired interferon-gamma responses, increased interleukin-17 expression, and a tumor necrosis factor-alpha transcriptional program in invasive aspergillosis*. J Infect Dis, 2009. **200**(8): p. 1341-51.
166. van de Veerdonk, F.L., et al., *Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview*. BMB Rep, 2009. **42**(12): p. 776-87.
167. Way, E.E., K. Chen, and J.K. Kolls, *Dysregulation in lung immunity - the protective and pathologic Th17 response in infection*. Eur J Immunol, 2013. **43**(12): p. 3116-24.
168. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
169. Bacher, P., et al., *Regulatory T Cell Specificity Directs Tolerance versus Allergy against Aeroantigens in Humans*. Cell, 2016. **167**(4): p. 1067-1078 e16.
170. Grunig, G., et al., *Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis*. J Exp Med, 1997. **185**(6): p. 1089-99.
171. Reza Hosseini, O., et al., *Use of T Cell Mediated Immune Functional Assays for Adjustment of Immunosuppressive or Anti-infective Agents in Solid Organ Transplant Recipients: A Systematic Review*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 567715.
172. Bacher, P., et al., *Fungus-specific CD4(+) T cells for rapid identification of invasive pulmonary mold infection*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **191**(3): p. 348-52.
173. Steinbach, A., et al., *Mould-reactive T cells for the diagnosis of invasive mould infection-A prospective study*. Mycoses, 2019. **62**(7): p. 562-569.

174. Weis, P., et al., *Development and evaluation of a whole blood-based approach for flow cytometric quantification of CD154+ mould-reactive T cells*. *Med Mycol*, 2020. **58**(2): p. 187-196.
175. Wurster, S., et al., *Intra- and inter-individual variability of Aspergillus fumigatus reactive T-cell frequencies in healthy volunteers in dependency of mould exposure in residential and working environment*. *Mycoses*, 2017. **60**(10): p. 668-675.
176. Adekambi, T., et al., *Biomarkers on patient T cells diagnose active tuberculosis and monitor treatment response*. *J Clin Invest*, 2015. **125**(5): p. 1827-38.
177. Cantini, F., L. Niccoli, and D. Goletti, *Tuberculosis risk in patients treated with non-anti-tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) targeted biologics and recently licensed TNF-alpha inhibitors: data from clinical trials and national registries*. *J Rheumatol Suppl*, 2014. **91**: p. 56-64.
178. Getahun, H., et al., *Management of latent Mycobacterium tuberculosis infection: WHO guidelines for low tuberculosis burden countries*. *Eur Respir J*, 2015. **46**(6): p. 1563-76.
179. Albert-Vega, C., et al., *Immune Functional Assays, From Custom to Standardized Tests for Precision Medicine*. *Frontiers in immunology*, 2018. **9**: p. 2367-2367.
180. Sotgiu, G., et al., *QuantiFERON TB Gold Plus for the diagnosis of tuberculosis: a systematic review and meta-analysis*. *J Infect*, 2019. **79**(5): p. 444-453.
181. Plebani, M., *Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine?* *Clin Chem Lab Med*, 2006. **44**(6): p. 750-9.
182. Lalvani, A., *Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy*. *Chest*, 2007. **131**(6): p. 1898-906.
183. OxfordImmunotec, *OxfordImmunotec Ltd. T-SPOT.TB Package Insert TB-US-TG-MPN081-0001 V2 Abingdon, UK. 2018*.
184. Chee, C.B., et al., *Comparison of sensitivities of two commercial gamma interferon release assays for pulmonary tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(6): p. 1935-40.
185. Janssens, J.P., et al., *Quantitative scoring of an interferon- γ assay for differentiating active from latent tuberculosis*. *European Respiratory Journal*, 2007. **30**(4): p. 722.
186. Mancuso, J.D., et al., *Discordance among commercially available diagnostics for latent tuberculosis infection*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012. **185**(4): p. 427-34.
187. King, T.C., et al., *T-SPOT.TB Interferon- γ Release Assay Performance in Healthcare Worker Screening at Nineteen U.S. Hospitals*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015. **192**(3): p. 367-73.
188. Venkatappa, T.K., et al., *Comparing QuantiFERON-TB Gold Plus with Other Tests To Diagnose Mycobacterium tuberculosis Infection*. *J Clin Microbiol*, 2019. **57**(11).
189. Nienhaus, A., et al., *Systematic review of cost and cost-effectiveness of different TB-screening strategies*. *BMC Health Services Research*, 2011. **11**(1): p. 247.
190. Greveson, K., et al., *Yield and cost effectiveness of mycobacterial infection detection using a simple IGRA-based protocol in UK subjects with inflammatory bowel disease suitable for anti-TNF α therapy*. *J Crohns Colitis*, 2013. **7**(5): p. 412-8.
191. Kim, S.H., et al., *Clinical applications of interferon- γ releasing assays for cytomegalovirus to differentiate cytomegalovirus disease from bystander activation: a pilot proof-of-concept study*. *Korean J Intern Med*, 2017. **32**(5): p. 900-909.
192. Kim, J.W., et al., *Varicella-zoster virus-specific cell-mediated immunity and herpes zoster development in multiple myeloma patients receiving bortezomib- or thalidomide-based chemotherapy*. *J Clin Virol*, 2015. **73**: p. 64-69.

193. Schachtner, T., et al., *The Loss of BKV-specific Immunity From Pretransplantation to Posttransplantation Identifies Kidney Transplant Recipients at Increased Risk of BKV Replication*. *Am J Transplant*, 2015. **15**(8): p. 2159-69.
194. Kotton, C.N., et al., *The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation*. *Transplantation*, 2018. **102**(6): p. 900-931.
195. Dziedzic, M., I. Sadowska-Krawczenko, and J. Styczynski, *Risk Factors for Cytomegalovirus Infection After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Malignancies: Proposal for Classification*. *Anticancer Res*, 2017. **37**(12): p. 6551-6556.
196. Wagner-Drouet, E., et al., *Standardized monitoring of cytomegalovirus-specific immunity can improve risk stratification of recurrent cytomegalovirus reactivation after hematopoietic stem cell transplantation*. *Haematologica*, 2021. **106**(2): p. 363-374.
197. Wagner-Drouet, E., et al., *Standardized monitoring of cytomegalovirus-specific immunity can improve risk stratification of recurrent cytomegalovirus reactivation after hematopoietic stem cell transplantation*. *Haematologica*, 2019.
198. Lilleri, D. and G. Gerna, *Strategies to control human cytomegalovirus infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients*. *Immunotherapy*, 2016. **8**(9): p. 1135-49.
199. Avetisyan, G., et al., *Evaluation of intervention strategy based on CMV-specific immune responses after allogeneic SCT*. *Bone Marrow Transplant*, 2007. **40**(9): p. 865-9.
200. Gratama, J.W., et al., *Monitoring cytomegalovirus IE-1 and pp65-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk for recurrent CMV reactivations*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2008. **74**(4): p. 211-20.
201. Fleming, T., J. Dunne, and B. Crowley, *Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8(+) T-Cell responses using the QuantiFERON-CMV assay in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients attending an Irish hospital*. *J Med Virol*, 2010. **82**(3): p. 433-40.
202. Tey, S.K., et al., *Clinical assessment of anti-viral CD8+ T cell immune monitoring using QuantiFERON-CMV(R) assay to identify high risk allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients with CMV infection complications*. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e74744.
203. Lee, S.M., et al., *Clinical Usefulness of Monitoring Cytomegalovirus-Specific Immunity by Quantiferon-CMV in Pediatric Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Recipients*. *Ann Lab Med*, 2017. **37**(3): p. 277-281.
204. Yong, M.K., et al., *Identifying Cytomegalovirus Complications Using the Quantiferon-CMV Assay After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. *J Infect Dis*, 2017. **215**(11): p. 1684-1694.
205. Walker, S., et al., *Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV*. *Transpl Infect Dis*, 2007. **9**(2): p. 165-70.
206. Santin, M., L. Munoz, and D. Rigau, *Interferon-gamma release assays for the diagnosis of tuberculosis and tuberculosis infection in HIV-infected adults: a systematic review and meta-analysis*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e32482.
207. Vincenti, D., et al., *Response to region of difference 1 (RD1) epitopes in human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals enrolled with suspected active tuberculosis: a pilot study*. *Clin Exp Immunol*, 2007. **150**(1): p. 91-8.
208. Doberne, D., R.L. Gaur, and N. Banaei, *Preanalytical delay reduces sensitivity of QuantiFERON-TB gold in-tube assay for detection of latent tuberculosis infection*. *J Clin Microbiol*, 2011. **49**(8): p. 3061-4.

209. Yun, J.W., et al., *Significant reduction in rate of indeterminate results of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test by shortening incubation delay*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(1): p. 90-4.
210. Piana, F., et al., *Use of T-SPOT.TB in latent tuberculosis infection diagnosis in general and immunosuppressed populations*. New Microbiol, 2007. **30**(3): p. 286-90.
211. Vassilopoulos, D., et al., *Usefulness of enzyme-linked immunospot assay (Elispot) compared to tuberculin skin testing for latent tuberculosis screening in rheumatic patients scheduled for anti-tumor necrosis factor treatment*. J Rheumatol, 2008. **35**(7): p. 1271-6.
212. Clark, S.A., et al., *Tuberculosis antigen-specific immune responses can be detected using enzyme-linked immunospot technology in human immunodeficiency virus (HIV)-1 patients with advanced disease*. Clin Exp Immunol, 2007. **150**(2): p. 238-44.
213. Potenza, L., et al., *Mucorales-specific T cells emerge in the course of invasive mucormycosis and may be used as a surrogate diagnostic marker in high-risk patients*. Blood, 2011. **118**(20): p. 5416-5419.
214. Potenza, L., et al., *Mucorales-Specific T Cells in Patients with Hematologic Malignancies*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0149108.
215. Potenza, L., et al., *Characterization of specific immune responses to different Aspergillus antigens during the course of invasive Aspergillosis in hematologic patients*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74326.
216. Chaudhary, N., J.F. Staab, and K.A. Marr, *Healthy human T-Cell Responses to Aspergillus fumigatus antigens*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9036.
217. Bacher, P., et al., *Antigen-reactive T cell enrichment for direct, high-resolution analysis of the human naive and memory Th cell repertoire*. J Immunol, 2013. **190**(8): p. 3967-76.
218. Frensch, M., et al., *Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression*. Nat Med, 2005. **11**(10): p. 1118-24.
219. Bacher, P., et al., *Identification of immunogenic antigens from Aspergillus fumigatus by direct multiparameter characterization of specific conventional and regulatory CD4+ T cells*. J Immunol, 2014. **193**(7): p. 3332-43.
220. Stuehler, C., et al., *Multispecific Aspergillus T cells selected by CD137 or CD154 induce protective immune responses against the most relevant mold infections*. J Infect Dis, 2015. **211**(8): p. 1251-61.
221. Page, L., et al., *Impact of immunosuppressive and antifungal drugs on PBMC- and whole blood-based flow cytometric CD154(+)Aspergillus fumigatus specific T-cell quantification*. Med Microbiol Immunol, 2020.
222. Wurster, S., et al., *Quantification of A. fumigatus-specific CD154+ T-cells-preanalytic considerations*. Med Mycol, 2017. **55**(2): p. 223-227.
223. Jolink, H., et al., *T helper 2 response in allergic bronchopulmonary aspergillosis is not driven by specific Aspergillus antigens*. Allergy, 2015. **70**(10): p. 1336-9.
224. Rubio-Carrasquilla, M., et al., *An interferon gamma release assay specific for Histoplasma capsulatum to detect asymptomatic infected individuals: A proof of concept study*. Med Mycol, 2019. **57**(6): p. 724-732.
225. Adenis, A.A., C. Aznar, and P. Couppie, *Histoplasmosis in HIV-Infected Patients: A Review of New Developments and Remaining Gaps*. Curr Trop Med Rep, 2014. **1**: p. 119-128.
226. Vergidis, P., et al., *Histoplasmosis complicating tumor necrosis factor-alpha blocker therapy: a retrospective analysis of 98 cases*. Clin Infect Dis, 2015. **61**(3): p. 409-17.

227. Ostrosky-Zeichner, L., *Invasive mycoses: diagnostic challenges*. Am J Med, 2012. **125**(1 Suppl): p. S14-24.
228. De Pauw, B., et al., *Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group*. Clin Infect Dis, 2008. **46**(12): p. 1813-21.
229. Schnack, E., *Herstellung rekombinanter Proteine für die Entwicklung T-Zell-basierter Diagnostikverfahren für den Nachweis von Erkrankungen, die durch den pathogenen Schimmelpilz Aspergillus fumigatus ausgelöst werden*. 2020, LMU München: München.
230. Lauruschkat, C.D., et al., *T-Cell Immune Surveillance in Allogenic Stem Cell Transplant Recipients: Are Whole Blood-Based Assays Ready to Challenge ELISPOT?* Open Forum Infect Dis, 2021. **8**(1): p. ofaa547.
231. Lauruschkat, C.D., et al. *Establishment of a whole blood ELISA to quantify T-cellular cytokine release in response to Aspergillus fumigatus antigens*. in *Advances Against Aspergillosis and Mucormycosis*. 2020. Lugano, Switzerland.
232. Lauruschkat, C.D., et al., *Susceptibility of A. fumigatus-specific T-cell assays to pre-analytic blood storage and PBMC cryopreservation greatly depends on readout platform and analytes*. Mycoses, 2018. **61**(8): p. 549-560.
233. Wang, L., et al., *Standardization of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells through a resting process for clinical immunomonitoring--Development of an algorithm*. Cytometry A, 2016. **89**(3): p. 246-58.
234. Biologend. *ELISA MAX™ Deluxe Set Instructions*. Available from: https://www.biologend.com/Files/Images/media_assets/pro_detail/datasheets/430104_Human_IFN-gamma_Deluxe_R05.pdf.
235. Selliah, N., et al., *Flow Cytometry Method Validation Protocols*. Current Protocols in Cytometry, 2019. **87**(1): p. e53.
236. Journal), W.M. *Secondary Publication in a Dissertation*. 20.10.2022; *Secondary Publication in a Dissertation*]. Available from: <https://www.wiley.com/network/researchers/latest-content/how-to-clear-permissions-for-a-thesis-or-dissertation>.
237. Allegra, A., et al., *Secondary Immunodeficiency in Hematological Malignancies: Focus on Multiple Myeloma and Chronic Lymphocytic Leukemia*. Frontiers in Immunology, 2021. **12**(4330).
238. Pagano, L., et al., *Current therapeutic approaches to fungal infections in immunocompromised hematological patients*. Blood Rev, 2010. **24**(2): p. 51-61.
239. Slater, M., et al., *Reproducibility Of QuantiFERON-TB Gold In-Tube Essay: A Systematic Review*, in *B24. DIAGNOSIS AND TREATMENT IN THE SPECTRUM OF TUBERCULOSIS*. p. A2557-A2557.
240. Perry, S., et al., *Reproducibility of QuantiFERON-TB gold in-tube assay*. Clin Vaccine Immunol, 2008. **15**(3): p. 425-32.
241. Detjen, A.K., et al., *Short-term reproducibility of a commercial interferon gamma release assay*. Clin Vaccine Immunol, 2009. **16**(8): p. 1170-5.
242. Wang, S.H., et al., *Validation of increased blood storage times with the T-SPOT. TB assay with T-Cell Xtend reagent in individuals with different tuberculosis risk factors*. 2012.

243. Yun, J.W., et al., *Significant reduction in rate of indeterminate results of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test by shortening incubation delay*. 2014.
244. Jeurink, P.V., et al., *T cell responses in fresh and cryopreserved peripheral blood mononuclear cells: kinetics of cell viability, cellular subsets, proliferation, and cytokine production*. *Cryobiology*, 2008. **57**(2): p. 91-103.
245. Costantini, A., et al., *Effects of cryopreservation on lymphocyte immunophenotype and function*. *J Immunol Methods*, 2003. **278**(1-2): p. 145-55.
246. Lauruschkat, C.D., et al., *Development of a Simple and Robust Whole Blood Assay with Dual Co-Stimulation to Quantify the Release of T-Cellular Signature Cytokines in Response to Aspergillus fumigatus Antigens*. *J Fungi (Basel)*, 2021. **7**(6).
247. U.S. Department of Health and Human Services, F.D.A., *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. 37. <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>. 2018.
248. Tuuminen, T., et al., *Assessment of Imprecision in Gamma Interferon Release Assays for the Detection of Exposure to *Mycobacterium tuberculosis**. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2010. **17**(4): p. 596-601.
249. Nemes, E., et al., *Optimization and Interpretation of Serial QuantiFERON Testing to Measure Acquisition of Mycobacterium tuberculosis Infection*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017. **196**(5): p. 638-648.
250. Gaur, R.L., M. Pai, and N. Banaei, *Impact of blood volume, tube shaking, and incubation time on reproducibility of QuantiFERON-TB gold in-tube assay*. *J Clin Microbiol*, 2013. **51**(11): p. 3521-6.
251. Min, J.W., et al., *Effect of prolonged incubation time on results of the QuantiFERON TB gold in-tube assay for diagnosis of latent tuberculosis infection*. *Clin Vaccine Immunol*, 2013. **20**(9): p. 1377-80.
252. Brown, J., et al., *Frequency and significance of indeterminate and borderline Quantiferon Gold TB IGRA results*. *Eur Respir J*, 2017. **50**(4).
253. Herrera, V., et al., *Immediate incubation reduces indeterminate results for QuantiFERON-TB Gold in-tube assay*. *J Clin Microbiol*, 2010. **48**(8): p. 2672-6.
254. Feng, P.J., et al., *Impact of T-Cell Xtend on T-SPOT.TB Assay in High-Risk Individuals after Delayed Blood Sample Processing*. *J Clin Microbiol*, 2021. **59**(5).
255. Agrawal, L., et al., *Understanding preanalytical variables and their effects on clinical biomarkers of oncology and immunotherapy*. *Semin Cancer Biol*, 2018. **52**(Pt 2): p. 26-38.
256. Iwanaga, N. and J.K. Kolls, *Updates on T helper type 17 immunity in respiratory disease*. *Immunology*, 2019. **156**(1): p. 3-8.
257. Papadopoulou, A., et al., *Adoptive transfer of Aspergillus-specific T cells as a novel anti-fungal therapy for hematopoietic stem cell transplant recipients: Progress and challenges*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2016. **98**: p. 62-72.
258. McKenna, K.C., et al., *Delayed processing of blood increases the frequency of activated CD11b+ CD15+ granulocytes which inhibit T cell function*. *J Immunol Methods*, 2009. **341**(1-2): p. 68-75.
259. Betsou, F., et al., *Biospecimen Science of Blood for Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Functional Applications*. *Current Pathobiology Reports*, 2019. **7**(2): p. 17-27.

260. Cowburn, A.S., et al., *The survival effect of TNF-alpha in human neutrophils is mediated via NF-kappa B-dependent IL-8 release*. Eur J Immunol, 2004. **34**(6): p. 1733-43.
261. Beyersdorf, N., T. Kerkau, and T. Hünig, *CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective*. Immunotargets Ther, 2015. **4**: p. 111-22.
262. Kalia, V. and S. Sarkar, *Regulation of Effector and Memory CD8 T Cell Differentiation by IL-2 – A Balancing Act*. Frontiers in Immunology, 2018. **9**(2987).
263. Talbot, E.A., et al., *Maintenance of sensitivity of the T-SPOT. TB assay after overnight storage of blood samples, Dar es Salaam, Tanzania*. 2012.
264. Lenders, L.M., R. Meldau, and v. Zyl-Smit, *Comparison of same day versus delayed enumeration of TB-specific T cell responses*. 2010.
265. Bull, M., et al., *Defining blood processing parameters for optimal detection of cryopreserved antigen-specific responses for HIV vaccine trials*. J Immunol Methods, 2007. **322**(1-2): p. 57-69.
266. Chen, H., et al., *Functional comparison of PBMCs isolated by Cell Preparation Tubes (CPT) vs. Lymphoprep Tubes*. BMC Immunology, 2020. **21**(1): p. 15.
267. Kreher, C.R., et al., *CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays*. J Immunol Methods, 2003. **278**(1-2): p. 79-93.
268. Germann, A., et al., *Standardized Serum-Free Cryomedia Maintain Peripheral Blood Mononuclear Cell Viability, Recovery, and Antigen-Specific T-Cell Response Compared to Fetal Calf Serum-Based Medium*. Biopreserv Biobank, 2011. **9**(3): p. 229-236.
269. Guo, G.H., et al., *Clinical evaluation of the levels of 12 cytokines in serum/plasma under various storage conditions using evidence biochip arrays*. Mol Med Rep, 2013. **7**(3): p. 775-780.
270. Graham, C., et al., *Stability of pro- and anti-inflammatory immune biomarkers for human cohort studies*. Journal of Translational Medicine, 2017. **15**(1): p. 53.
271. *batch analysis*. (n.d.) Medical Dictionary. (2009). 25.8.2021; <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/batch+analysis>.
272. Ogonek, J., et al., *Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 507.
273. Spijkerman, R., et al., *Automated flow cytometry enables high performance point-of-care analysis of leukocyte phenotypes*. Journal of Immunological Methods, 2019. **474**: p. 112646.
274. Joslin, J., et al., *A Fully Automated High-Throughput Flow Cytometry Screening System Enabling Phenotypic Drug Discovery*. SLAS Discov, 2018. **23**(7): p. 697-707.
275. Verschoor, C.P., et al., *An Introduction to Automated Flow Cytometry Gating Tools and Their Implementation*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 380.
276. Lee, H., et al., *High-Throughput Analysis of Clinical Flow Cytometry Data by Automated Gating*. Bioinformatics and Biology Insights, 2019. **13**: p. 1177932219838851.
277. Meehan, S., et al., *Automated subset identification and characterization pipeline for multidimensional flow and mass cytometry data clustering and visualization*. Communications Biology, 2019. **2**(1): p. 229.
278. Chakrabarti, A., et al., *Invasive aspergillosis in developing countries*. Med Mycol, 2011. **49 Suppl 1**: p. S35-47.
279. Olum, R., et al., *Mapping of Chronic Pulmonary Aspergillosis in Africa*. J Fungi (Basel), 2021. **7**(10).
280. Deenadayalan, A., P. Maddineni, and A. Raja, *Comparison of whole blood and PBMC assays for T-cell functional analysis*. BMC Res Notes, 2013. **6**: p. 120.

281. Silva, D., et al., *A whole blood assay as a simple, broad assessment of cytokines and chemokines to evaluate human immune responses to Mycobacterium tuberculosis antigens*. *Acta Trop*, 2013. **127**(2): p. 75-81.
282. Minns, D., K.J. Smith, and E.G. Findlay, *Orchestration of Adaptive T Cell Responses by Neutrophil Granule Contents*. *Mediators Inflamm*, 2019. **2019**: p. 8968943.
283. Ivashkiv, L.B., *IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy*. *Nat Rev Immunol*, 2018. **18**(9): p. 545-558.
284. McGeachy, M.J., D.J. Cua, and S.L. Gaffen, *The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease*. *Immunity*, 2019. **50**(4): p. 892-906.
285. Bieber, T., *Interleukin-13: Targeting an underestimated cytokine in atopic dermatitis*. *Allergy*, 2020. **75**(1): p. 54-62.
286. Nomura, L.E., J.M. Walker, and H.T. Maecker, *Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4+ T cells*. *Cytometry*, 2000. **40**(1): p. 60-68.
287. OxfordImmunotec. *FAQ T-Spot.TB 2021 28.08.2021*]; Available from: <https://www.oxforddiagnosticlaboratories.eu/resources/faqs/#5>.
288. Jung, J., et al., *Diagnostic usefulness of dynamic changes of CMV-specific T-cell responses in predicting CMV infections in HCT recipients*. *J Clin Virol*, 2017. **87**: p. 5-11.
289. Banas, B., et al., *Validation of T-Track[®] CMV to assess the functionality of cytomegalovirus-reactive cell-mediated immunity in hemodialysis patients*. *BMC Immunology*, 2017. **18**(1): p. 15.
290. Pai, M., et al., *Gamma interferon release assays for detection of Mycobacterium tuberculosis infection*. *Clin Microbiol Rev*, 2014. **27**(1): p. 3-20.
291. Cramer, R., et al., *Disease-specific recombinant allergens for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis*. *Int Immunol*, 1998. **10**(8): p. 1211-6.
292. Hemmann, S., et al., *Skin test reactivity to 2 recombinant Aspergillus fumigatus allergens in A fumigatus-sensitized asthmatic subjects allows diagnostic separation of allergic bronchopulmonary aspergillosis from fungal sensitization*. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. **104**(3 Pt 1): p. 601-7.
293. Gamsky, T.E. and R.C. Alexander, *QuantiFERON-TB blood testing in the occupational setting*. *J Occup Environ Med*, 2008. **50**(1): p. 3-4.
294. Gaur, R.L., M.M. Suhosk, and N. Banaei, *In Vitro Immunomodulation of a Whole Blood IFN- γ Release Assay Enhances T Cell Responses in Subjects with Latent Tuberculosis Infection*. *PLOS ONE*, 2012. **7**(10): p. e48027.
295. Mogensen, T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses*. *Clin Microbiol Rev*, 2009. **22**(2): p. 240-73, Table of Contents.
296. Munford, R.S., *Endotoxemia-menace, marker, or mistake?* *Journal of leukocyte biology*, 2016. **100**(4): p. 687-698.
297. Opal, S.M., et al., *Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock*. *J Infect Dis*, 1999. **180**(5): p. 1584-9.
298. Lauruschkat, C.D., et al., *Chronic Occupational Mold Exposure Drives Expansion of Aspergillus-Reactive Type 1 and Type 2 T-Helper Cell Responses*. *J Fungi (Basel)*, 2021. **7**(9).
299. Sehgal, I.S. and R. Agarwal, *Specific IgE is better than skin testing for detecting Aspergillus sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in asthma*. *Chest*, 2015. **147**(5): p. e194.
300. de Barros Bezerra, G.F., et al., *IgE serum concentration against airborne fungi in children with respiratory allergies*. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2016. **12**: p. 18.

301. Potenza, L., et al., *Assessment of Aspergillus-specific T cells for diagnosis of invasive aspergillosis in a leukemic child with liver lesions mimicking hepatosplenic candidiasis*. Clin Vaccine Immunol, 2008. **15**(10): p. 1625-8.
302. Qiagen. *Clinical Review Clinical experience with QuantiFERON® - TB Gold HIV/AIDS*. 2016 03.09.2021]; Available from: https://www.quantiferon.com/wp-content/uploads/2017/04/PROM-9009-001_1099403_-Bro_QFTPlus_HIVClinGuide_ROW.pdf.
303. Lundtoft, C., et al., *Alternative Quantiferon cytokines for diagnosis of children with active tuberculosis and HIV co-infection in Ghana*. Med Microbiol Immunol, 2017. **206**(3): p. 259-265.
304. Schmidt, S., et al., *Characterization of the Cellular Immune Responses to Rhizopus oryzae With Potential Impact on Immunotherapeutic Strategies in Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. The Journal of Infectious Diseases, 2012. **206**(1): p. 135-139.
305. Bacher, P., et al., *Clinical-scale isolation of the total Aspergillus fumigatus-reactive T-helper cell repertoire for adoptive transfer*. Cytotherapy, 2015. **17**(10): p. 1396-405.
306. Jolink, H., et al., *T helper 2 response in allergic bronchopulmonary aspergillosis is not driven by specific Aspergillus antigens*. Allergy, 2015. **70**(10): p. 1336-1339.
307. Zielinska-Jankiewicz, K., et al., *Microbiological contamination with moulds in work environment in libraries and archive storage facilities*. Ann Agric Environ Med, 2008. **15**(1): p. 71-8.
308. García-Cela, E., et al., *Fungal diversity, incidence and mycotoxin contamination in grapes from two agro-climatic Spanish regions with emphasis on Aspergillus species*. J Sci Food Agric, 2015. **95**(8): p. 1716-29.
309. Yamamoto, N., D.G. Shendell, and J. Peccia, *Assessing allergenic fungi in house dust by floor wipe sampling and quantitative PCR*. Indoor Air, 2011. **21**(6): p. 521-530.
310. Sester, U., et al., *Impaired detection of *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients using high levels of immunosuppressive drugs*. European Respiratory Journal, 2009. **34**(3): p. 702-710.
311. Helwig, U., et al., *Corticosteroids and immunosuppressive therapy influence the result of QuantiFERON TB Gold testing in inflammatory bowel disease patients*. J Crohns Colitis, 2012. **6**(4): p. 419-24.
312. B elard, E., et al., *Prednisolone treatment affects the performance of the QuantiFERON gold in-tube test and the tuberculin skin test in patients with autoimmune disorders screened for latent tuberculosis infection*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(11): p. 2340-9.
313. Esmail, H. and R.J. Wilkinson, *Minimizing Tuberculosis Risk in Patients Receiving Anti-TNF Therapy*. Ann Am Thorac Soc, 2017. **14**(5): p. 621-623.
314. Molina, J.R., et al., *Voriconazole as primary antifungal prophylaxis in children undergoing allo-SCT*. Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(4): p. 562-7.
315. Lopez-Sanchez, C., et al., *Use of micafungin as antifungal prophylaxis in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) in Spain (GETH-MIC)*. Rev Esp Quimioter, 2020. **33**(2): p. 110-115.
316. Benitez, L.L. and P.L. Carver, *Adverse Effects Associated with Long-Term Administration of Azole Antifungal Agents*. Drugs, 2019. **79**(8): p. 833-853.
317. Benedict, K., et al., *Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States*. Clin Infect Dis, 2019. **68**(11): p. 1791-1797.

318. Baddley, J.W., et al., *Antifungal therapy and length of hospitalization in transplant patients with invasive aspergillosis*. *Medical Mycology*, 2013. **51**(2): p. 128-135.
319. Baddley, J.W., et al., *Aspergillosis in Intensive Care Unit (ICU) patients: epidemiology and economic outcomes*. *BMC Infectious Diseases*, 2013. **13**(1): p. 29.
320. Selleslag, D., D. Vogelaers, and S. Marbaix, *ECONOMIC EVALUATION OF VORICONAZOLE VERSUS CASPOFUNGIN FOR THE TREATMENT OF INVASIVE ASPERGILLOSIS IN BELGIUM*. *Acta Clinica Belgica*, 2009. **64**(5): p. 393-398.
321. Deml, D.L., *Potenzieller Preis eines T-Zell-Tests für Aspergillus* P.D.J.L. Chris Lauruschkat, Editor. 2017.
322. Kontoyiannis, D.P., et al., *Culture-Documented Invasive Mold Infections at MD Anderson Cancer Center in Houston, Texas, Pre- and Post-Hurricane Harvey*. *Open Forum Infect Dis*, 2019. **6**(4): p. ofz138.
323. Mendell, M.J., J.M. Macher, and K. Kumagai, *Measured moisture in buildings and adverse health effects: A review*. *Indoor Air*, 2018. **28**(4): p. 488-499.
324. Mendell, M.J. and K. Kumagai, *Observation-based metrics for residential dampness and mold with dose-response relationships to health: A review*. *Indoor Air*, 2017. **27**(3): p. 506-517.
325. Bartoletti, M., et al., *Epidemiology of invasive pulmonary aspergillosis among COVID-19 intubated patients: a prospective study*. *Clin Infect Dis*, 2020.
326. White, P.L., et al., *A National Strategy to Diagnose Coronavirus Disease 2019-Associated Invasive Fungal Disease in the Intensive Care Unit*. *Clin Infect Dis*, 2021. **73**(7): p. e1634-e1644.
327. Tappe, B., et al., *COVID-19 patients share common, corticosteroid-independent features of impaired host immunity to pathogenic molds*. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 954985.
328. Wurster, S., et al., *Protective Activity of Programmed Cell Death Protein 1 Blockade and Synergy With Caspofungin in a Murine Invasive Pulmonary Aspergillosis Model*. *J Infect Dis*, 2020. **222**(6): p. 989-994.
329. Wurster, S., N.D. Albert, and D.P. Kontoyiannis, *Candida auris Bloodstream Infection Induces Upregulation of the PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Pathway in an Immunocompetent Mouse Model*. *mSphere*, 2022: p. e0081721.
330. Wurster, S., et al., *Blockade of the PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Pathway Improves Infection Outcomes and Enhances Fungicidal Host Defense in a Murine Model of Invasive Pulmonary Mucormycosis*. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 838344.
331. Pinchuk, L.M. and N.M. Filipov, *Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice*. *Immunity & Ageing*, 2008. **5**(1): p. 1.
332. Page, L., et al. *Whole blood based flow cytometry for herpes simplex 1- and cytomegalovirus-reactive T cell responses: minimizing time and blood requirements for virus-reactive T cell phenotyping*. in *31st Annual Meeting of the Society for Virology*. 2022. Munich.

6 Appendix

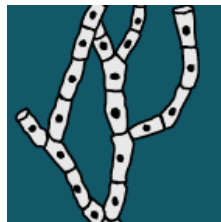
6.1 Review-Artikel „Immunomodulation as a Therapy for *Aspergillus* Infection: Current Status and Future Perspectives.“

Autorenliste:

Lauruschkat CD, Einsele H., Loeffler J.

Journal:

J Fungi (Basel). (EISSN 2309-608X)



Journal of
Fungi

Ausgabe:

2018 Dec 14;4(4):137

Doi:

<https://doi.org/10.3390/jof4040137>

Sekundäre Veröffentlichung:

Die sekundäre Veröffentlichung findet mit der schriftlichen Genehmigung des Journals unter der CC BY-Lizenz (*Open Access*) statt.

Review

Immunomodulation as a Therapy for *Aspergillus* Infection: Current Status and Future Perspectives

Chris D. Lauruschkat, Hermann Einsele and Juergen Loeffler *

Department of Internal Medicine II, University Hospital Wuerzburg, WÜ4i, Building C11, 97080 Wuerzburg, Germany; Lauruschka_c@ukw.de (C.D.L.); Einsele_h@ukw.de (H.E.)

* Correspondence: Loeffler_j@ukw.de; Tel.: +49-931-2013-6412; Fax: +49-931-2013-6409

Received: 15 November 2018; Accepted: 10 December 2018; Published: 14 December 2018



Abstract: Invasive aspergillosis (IA) is the most serious life-threatening infectious complication of intensive remission induction chemotherapy and allogeneic stem cell transplantation in patients with a variety of hematological malignancies. *Aspergillus fumigatus* is the most commonly isolated species from cases of IA. Despite the various improvements that have been made with preventative strategies and the development of antifungal drugs, there is an urgent need for new therapeutic approaches that focus on strategies to boost the host's immune response, since immunological recovery is recognized as being the major determinant of the outcome of IA. Here, we aim to summarize current knowledge about a broad variety of immunotherapeutic approaches against IA, including therapies based on the transfer of distinct immune cell populations, and the administration of cytokines and antibodies.

Keywords: Immunotherapy; invasive aspergillosis; *Aspergillus fumigatus*; fungal infections; innate immunity; adaptive immunity; cell therapy; cytokine therapy

1. Introduction

Within the last decade, the filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) has underlined its role as one of the most clinically relevant fungal pathogens. Conidia of this saprobic fungus can be isolated ubiquitously. Because of this high abundance, hundreds of spores of *Aspergillus* are inhaled daily by each individual [1]. Mucociliary clearance and phagocytic cells in the lung prevent disease in immunocompetent individuals. This includes alveolar macrophages, the major resident cells in the lung alveoli, which most efficiently engulf conidia in the lung [2].

The most severe disease caused by *Aspergillus* is invasive aspergillosis (IA). Major risk factors include immunosuppression, neutropenia, lymphopenia, and depletion of T cells [3]. Thus, IA occurs almost exclusively in immunocompromised patients. The incidence in allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) patients ranges from 4%–10%. Although many *Aspergilli* cause IA, *A. fumigatus* is responsible for more than 90% of all systemic *Aspergillus* infections [4].

Innate immunity is of major importance for the defense against *A. fumigatus*. In contrast to most bacterial pathogens, *A. fumigatus* undergoes major morphological changes during the early phase of infection. In the alveoli, inert spores swell, germinate, and grow into lung tissue, becoming subsequently angioinvasive and lastly undergoing hematogenous dissemination [5]. Cells of the innate immunity recognize the different fungal morphologies by distinct pattern recognition receptors (e.g., TLR2, TLR4, and dectin-1), which induce cell-specific and general defense mechanisms [6]. Upon stimulation with *A. fumigatus* in vitro, polymorphonuclear neutrophils (PMNs) release reactive oxygen intermediates and form neutrophil extracellular traps. Dendritic cells (DCs) release inflammatory cytokines (e.g., TNF- α and IL-1) and chemokines (e.g., IL-8 and CXCL10), which attract and activate other innate immune cell populations and build a bridge between the innate and the adaptive immunity by processing fungal antigens and presenting them to T cells. Natural killer (NK) cells degranulate and

secrete cytotoxic proteins (perforin, granzymes) in response to *A. fumigatus*, causing fungal damage, and produce Th1 cytokines and chemokines, again attracting and activating other innate immune cell populations [7–9].

Unfortunately, there is still a lack of reliable diagnostic and therapeutic tools, resulting in high mortality rates of up to 90%, depending on the patient cohort and the localization of the fungus [10]. Therapy of *Aspergillus* infection remains limited to only a handful of antifungal agents. Voriconazole is the drug of choice for primary therapy of IA, with isavuconazole and the liposomal formulation of amphotericin B serving as alternatives. Echinocandins (e.g., anidulafungin) and other mold-active azoles (e.g., itraconazole and posaconazole) remain for salvage therapy [11]. Recently, triazole-resistant *A. fumigatus* strains have increasingly been isolated from patients. These strains emerge most likely due to the extensive use of azole fungicides in agriculture and massively hinder antifungal treatment [12].

The following pages describe how different options of immune modulation have or will become alternatives to treat *Aspergillus* infection. In the case of immunocompromised patients, this usually involves therapeutic enhancement of immunity, including cell therapy approaches such as the transfusion of cells of the innate (granulocytes, dendritic cells, natural killer cells) and adaptive immune systems (T cells) as well as the administration of different cytokines, chemokines, and antibodies (Figure 1).

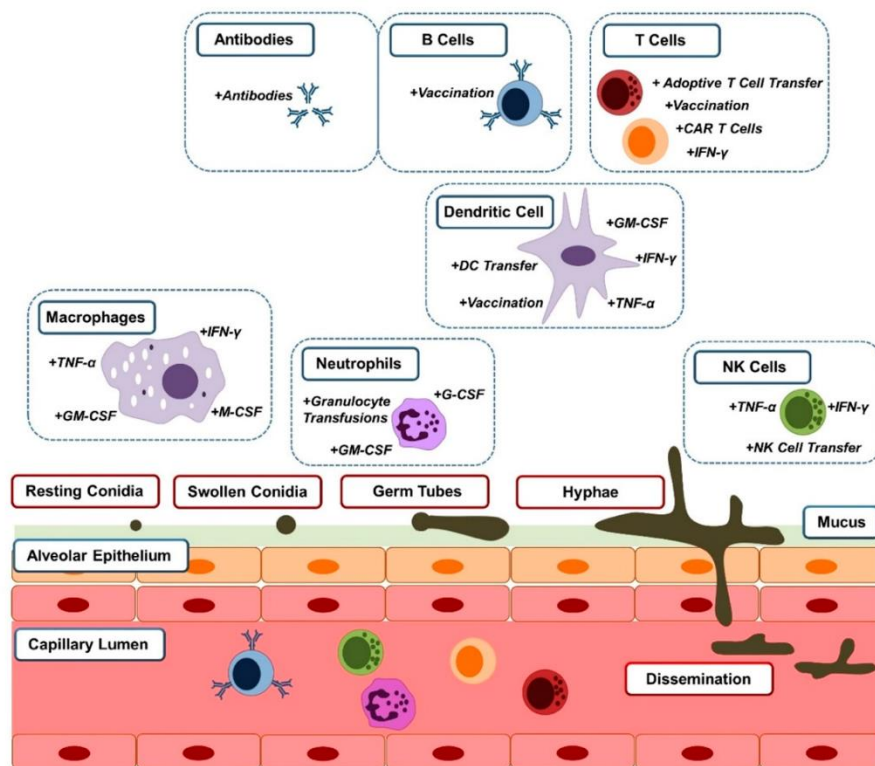


Figure 1. Cells of the innate and adaptive immune systems interact with different morphotypes of *Aspergillus fumigatus*. Macrophages clear resting and swollen conidia. Neutrophils attack all morphotypes of the fungus, while natural killer (NK) cells react to germ tubes and hyphae. Dendritic cells bridge the innate immune system to the adaptive immune system, which orchestrates fungal clearance of all morphotypes. Immunotherapeutic treatment options supporting these cells of the innate and adaptive immune systems are indicated next to the cell type they affect. Abbreviations: dendritic cell (DC); chimeric antigen receptor (CAR); granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF); granulocyte CSF (G-CSF); macrophage CSF (M-CSF); interferon (IFN) γ ; tumor necrosis factor (TNF) α .

2. Cell Therapy

2.1. Granulocyte Transfusion

PMNs are able to engulf fungus, release antimicrobial peptides, and form extracellular traps [13,14]. After allo-SCT, especially during neutropenia, the ability of the immune system to effectively clear fungus is severely limited. Numerous studies have evaluated the transfusion of high numbers of neutrophils to patients during neutropenia in the past decades. Allogeneic granulocyte transfusions (GTs) dramatically increase neutrophil counts, which is speculated to reverse the increased susceptibility to infections in allo-SCT patients [15,16]. GTs have shown low toxicity in allo-SCT patients and are considered to be safe [16,17].

In a phase I/II clinical trial, allogeneic neutrophil transfusion in combination with dexamethasone and granulocyte colony stimulating factors (G-CSF) increased neutrophil counts and response; however, none of the five patients suffering from aspergillosis survived [16]. Mousset et al. reported that in hematological patients, who received either prophylactic or interventional GTs, *Aspergillus* infection could be controlled in 17 out of 22 cases. This result, however, was limited by the inclusion of possible IA cases into the study population and the trial's nonrandomized nature [18]. In contrast, in a randomized phase III clinical trial in which GTs were given to neutropenic patients, no difference in 100-day survival of fungal infections was found. The authors of the study did not discriminate between different fungal infections; nonetheless, 49 of the 55 cases were *Aspergillus* infections [17]. In a randomized multicenter controlled study, 58 neutropenic subjects were treated with GTs plus G-CSF and dexamethasone in addition to standard microbial treatment. This arm of the trial was compared to 56 neutropenic patients on standard microbial treatment alone. No difference in infections between the groups was found. Both the control and treatment groups included only three proven aspergillosis cases [19], which made it difficult to draw conclusions for *Aspergillus* infections. Moreover, to improve the limited life span of transfused granulocytes, granulocyte progenitors for transfusion could be used. Bitmansour et al. have shown protection of neutropenic mice from *A. fumigatus* infection by granulocyte/monocyte progenitors [20,21].

In summary, although GTs have a lot of potential and new trials should be performed to further clarify the effect of GTs, no recommendation of treating allo-SCT patients with GTs is currently given [22]. The limited success of GT transfusions up to date might be a result of the transfusion of too low granulocyte numbers in some patients [19] and points to the necessity of overcoming multifactorial dysfunctions of the immune system after allo-SCT in order to prevent and clear IA.

2.2. Dendritic Cells (DCs)

DCs connect innate and adaptive immunity. They recognize fungus by pattern recognition receptors and process fungal antigens. After activation, they secrete cytokines and chemokines and migrate to the lymph nodes. Here they present these antigens to specific T cells, which in turn are activated and primed. Ex vivo DCs stimulated with *Aspergillus* antigens induce protective immune responses to the fungus after transfusion to the patient due to activation of *Aspergillus*-specific T cells and secretion of cytokines and chemokines, which support the clearance of the fungus by both the innate and adaptive immune systems [23–25].

DC stimulation with unmethylated CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in combination with one of the major *A. fumigatus* allergens, Asp f 16, induced a protective Th1 response in a hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) mouse model of IA [26]. The same protective Th1 response was found when DCs were stimulated by *A. fumigatus* conidia and transfected with IL-12 in a similar murine model [27]. In addition, DCs that had been transduced with IL-12 and stimulated by *A. fumigatus* were administered to neutropenic mice in a model for IA. The treatment led to less mortality and decreased fungal burden due to a strong Th1 response [28]. Asp f 16-stimulated DCs were more effective in generating a cytotoxic T lymphocyte response against *Aspergillus* when antigen presentation of DCs was succeeded by a second antigen presentation using Epstein-Barr

virus-transformed B lymphoblastoid cell lines. This method was described as more effective in generating Asp f 16-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs), and therefore would require less initial blood volume of the patient compared to DC stimulation alone [29].

In conclusion, an ex vivo stimulation of DCs and subsequent administration to the patient is cost inefficient, difficult to scale, and labor intensive. It shows, however, the therapeutic potential of fungal vaccination [30].

2.3. Natural Killer Cell Therapy

NK cells participate in the control of numerous pathogens, including viruses and fungi [31]. They have been shown to interact with *A. fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and Mucorales [32].

NK cells directly interact with *A. fumigatus* through the neural cell adhesion molecule (NCAM-1, CD56), and this interaction leads to the secretion of CC chemokine ligands CCL3, 4, and 5 [33]. After contact with *A. fumigatus*, NK cells become activated and release soluble factors such as perforin and granzyme, which mediate antifungal activity [34].

Higher reactive oxygen species (ROS) production and NK cell counts were associated with better control of IA in allo-SCT patients [35]. Referring to this study, Fernández-Ruiz et al. investigated NK cell counts of solid organ transplant recipients and correlated them to fungal infections. During the median follow-up period of 504.5 days, 10 out of 396 patients suffered from invasive fungal infection (IFI), and 4/10 IFI cases were classified as IA. Higher NK cell counts one month after transplantation decreased the incidence of fungal infections. In vivo, NK cells were the most significant contributor to IFN- γ secretion during the early stages of *Aspergillus* infection in the lungs of neutropenic mice. NK cell depletion resulted in higher mortality. In turn, fungal clearance was increased by transferring activated NK cells of wild-type mice to IFN- γ -deficient or wild-type neutropenic mice. The transfer of NK cells of IFN- γ -deficient mice into the same murine models, however, showed no effect [36]. Moreover, *Aspergillus niger* growth was partly inhibited due to increased NK cell activity in a murine model [37].

These results suggest that allogeneic NK cell transfer might be beneficial for the prevention of IA. Allogeneic NK cell transfer and transfer of the cell line NK92 after irradiation, which is already FDA-approved for clinical testing in certain types of cancer, were used in clinical studies and have a good safety profile in patients [38–42]. Nonetheless, they have to show their efficacy against IA in future studies.

2.4. Adoptive T Cell Transfer

The protective effect of *Aspergillus*-specific CD4⁺ cells of the Th1 lineage has been shown throughout the literature [43]. After allo-SCT, the adaptive immune system reconstitutes much slower than the innate immune system. Only a few *Aspergillus*-specific T cells can be measured 9–12 months after allo-SCT [44]. Therefore, an artificial increase of these specific T cells might help to clear *Aspergillus* in immunocompromised patients. For adoptive T cell transfer, T cells are isolated from the patient and stimulated with defined antigens. Consequently, T cell populations that are specific for the antigens are activated and proliferate. In turn, high numbers of these specific T cells are injected into the patient, where they recognize their target and aid the immune system in its elimination [45]. While the benefits of adoptive T cell transfer were illustrated in viral infections after transplantation, the development of similar techniques for the transfer of fungus-specific T cells lags behind [45].

One major obstacle to successful specific T cell transfer for *Aspergillus* in allo-SCT patients is the generation of an adequate number of *Aspergillus*-specific T cells with sufficient purity, using Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines. Because of the fast progression of IA, the enrichment process needs to be as fast as possible. Many groups have worked toward complying with these requirements [46–49]. Bacher et al. reported a GMP-compliant protocol, in which they were able to enrich *Aspergillus*-specific T cells 200-fold in the T cell population. After isolation, they depleted cytotoxic and

regulatory T cells, stimulated the remaining T cells with a GMP-grade *A. fumigatus* lysate, and isolated *A. fumigatus*-specific T cells with the help of the T cell activation marker CD137. This protocol is being used in an ongoing clinical trial (EudraCT Nr.2013-002914-11) [50]. However, another group has demonstrated that immunosuppressants such as cyclosporine A, methylprednisolone, as well as mycophenolic acid, lowered the number and activation of *Aspergillus*-specific protective Th1 cells. These immunosuppressants are frequently used after allo-SCT, complicating the application of adoptive T cell transfer in allo-SCT patients [51].

Up to this point, to our knowledge, there is only one clinical trial testing the efficacy and safety of adoptive T cell transfer in invasive fungal diseases. In this study, 10 patients with IA were treated by adoptive T cell transfer, while 13 IA patients in the control group did not receive a cell transfusion. The IA clearance rate was 90% in the treatment group compared to 53% in the control group. Infused cells did not cause graft versus host disease (GvHD) and showed a high IFN- γ to IL-10 ratio, indicating Th1 priming in the first three weeks after infusion. In contrast, patients in the control group had only a few naturally occurring *Aspergillus*-specific T cells 9–12 months after transplantation, exhibiting a nonprotective Th2 profile. In addition, patients receiving adoptive T cell transfer showed significantly decreased galactomannan antigenemia in comparison to the levels in the control group [44]. In order to shorten the time in between diagnosis and the transfusion of the cell product, off-the-shelf T cells specific for certain viruses were developed. They were found to be safe and only rarely caused mild GvHD (grade 1) [52]. Production of off-the-shelf T cells for transfusing IA patients is desirable.

Current findings have indicated that not only CD4⁺ T cell responses are important against *Aspergillus*, but cytotoxic CD8⁺ T cells might play an important role as well [53,54]. CTLs stimulated with Asp f 16 were able to induce increased Th1 responses. The transfer of Asp f 16-specific CTLs resulted in higher survival in a murine model of IA [55]. In consequence, adoptive T cell transfer for IA might not only be limited to CD4⁺ cells.

Adoptive T cell transfer is a promising tool for the fight against IA. GMP-compliant protocols for the production of sufficient numbers of *Aspergillus*-specific T cells are available, and off-the-shelf cell products against the infection might be developed soon. The results of the first clinical trial have been very promising, and there should be strong incentives for additional clinical trials.

2.5. Chimeric Antigen Receptors (CARs)

Chimeric antigen receptor (CAR) T cells are one of the most promising immunotherapeutic tools available and have shown their efficacy in primary clinical trials of B cell malignancies [56]. The FDA has already approved CAR T cell therapies for the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and B cell lymphoma in appropriate patient groups [57]. CARs are artificially designed receptors that are introduced into T cells. MHC unrestricted antigen recognition and the capability to recognize glycoproteins and lipids are only two of the many advantages of this approach [58,59]. CARs consist of two extracellular, one transmembrane, and one intracellular element. The task of the extracellular targeting element is to recognize the target. The single chain variable fragment (scFv) region of a monoclonal antibody targeting the desired antigen is usually used, but other targeting elements such as extracellular parts of naturally occurring receptors are also tested. The targeting element is linked to a spacer or linker, which gives the targeting element the flexibility to bind to the intended target [60]. The most common transmembrane domain used in CARs is the transmembrane spanning region of CD28 [61]. The intracellular domain assures signal delivery, resulting in the activation of the cell. In first-generation CARs, CD3- ζ was used for signal transduction. In second-generation CARs, a costimulatory domain, most commonly CD28 and 4-1BB, was added to CD3- ζ , resulting in better persistence of CAR T cells [62] (Figure 2).

The success of CAR T cells in B cell malignancies led to the attempt to use CARs for infections like aspergillosis. The group of Cooper et al. swapped the CD19 targeting element of a second-generation CAR, which is currently being evaluated in a clinical trial, with the extracellular

part of Dectin-1 [63,64]. Dectin-1 is a naturally occurring receptor of the innate immune system that is not expressed on T cells. Its ligand β -glucan is a polysaccharide found on the surface of many fungi, including *Aspergillus*. In addition to the extracellular part of Dectin-1, the Dectin-1 CAR (D-CAR) consisted of an IgG4 spacer, a CD28 transmembrane domain, and an intracellular domain of CD28 and CD3- ζ . The authors demonstrated that the D-CAR was activated by β -glucan and inhibited the growth of *A. fumigatus*. In addition, IFN- γ concentration increased after stimulation, and the perforin/granzyme pathway was likely activated [63]. Interestingly, steroid treatment did not inhibit the antifungal activity of the D-CAR.

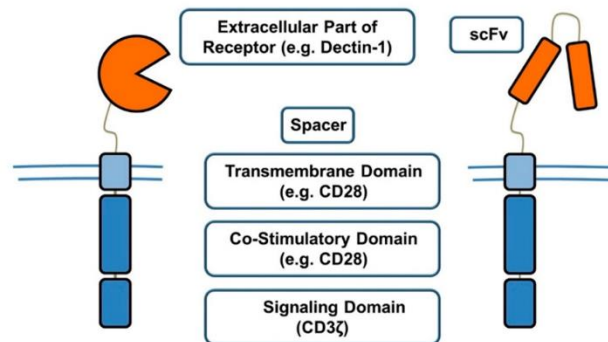


Figure 2. Second-generation chimeric antigen receptors (CARs) include a spacer, transmembrane domain, costimulatory domain, and signaling domain, as well as a targeting element. The two depicted CARs differ in their targeting element, which is usually the single chain variable fragment (scFv) of an antibody, but can also consist of the extracellular part of a receptor.

In light of this report, CART cells might not only be helpful for the treatment of B cell malignancies, but also for *Aspergillus* infections. However, there is only one report about the efficacy of CAR T cells against *Aspergillus* available, and more data needs to be generated. Additional CAR constructs containing alternative costimulatory domains and new targeting elements could be more efficient and should be evaluated. Moreover, the autologous generation of sufficient numbers of CAR T cells takes from just over one up to several weeks, which might lose critical time in an acute infection like IA [60].

3. Cytokine Therapy

One approach to fight aspergillosis after allo-SCT is to strengthen the immune system by administering cytokines. The most discussed cytokines are available as recombinant forms approved by the FDA, resulting in a more efficient evaluation on new patient cohorts. Cytokine therapies aimed at innate or both innate and adaptive immune systems have been assessed in several studies.

3.1. Colony Stimulating Factors

CSF treatment is aimed at increasing the capacity of the innate immune system to clear *Aspergillus*. This might be achieved by a faster reconstitution of innate immune cells mitigating risk factors such as neutropenia as well as increasing the activity of these cells against the fungus.

3.1.1. G-CSF

G-CSF increases neutrophil proliferation as well as maturation and is FDA-approved [65]. After stem cell transplantation, it is frequently administered during febrile episodes of neutropenia. Even though G-CSF does not decrease mortality caused by infections, it reduces time of neutropenia and febrile neutropenia-related hospitalization periods [66]. In an *A. fumigatus* mouse model, the addition of G-CSF to the antifungal caspofungin or caspofungin combined with amphotericin B-intralipid, resulted in higher survival rates of up to 78.9%, decreased fungal burden in organs,

and reduced serum galactomannan [67]. It also increased neutrophil counts and led to a four-fold higher killing of *A. fumigatus* conidia by PMNs compared to untreated controls [68].

Research shows that G-CSF shortens neutropenia in patients, but more studies investigating the effects of G-CSF on the prevalence and outcomes of *Aspergillus* infections have to be conducted [69,70].

3.1.2. M-CSF

In contrast to G-CSF and granulocyte-macrophage CSF (GM-CSF), macrophage CSF (M-CSF) is not FDA-approved. Its main function is the stimulation of macrophage growth [71]. In a clinical phase I/II trial, the regular antifungal therapy of 46 bone marrow transplant patients was supplemented by recombinant human M-CSF. While the clinical outcome of patients infected with various *Candida* species improved compared to historical controls, no positive effect on patients suffering from aspergillosis was observed [72]. Treating transplanted mice with M-CSF before *A. fumigatus* challenge not only reduced fungal organ burden, but also increased survival rates from 10% in saline-treated animals to 60% [73]. Prophylactic administration of M-CSF to neutropenic rabbits in a model of pulmonary aspergillosis lowered pulmonary injury and increased survival, most likely due to increased macrophage numbers and phagocytosis activity [74].

Only a few experiments have been performed with M-CSF. M-CSF treatment has shown some promise in animal models for aspergillosis and should be evaluated further for the treatment of patients after allo-SCT.

3.1.3. GM-CSF

Like G-CSF, GM-CSF is FDA-approved, but has a broader effect on immune cells. It plays a role in the differentiation of dendritic cells, as well as macrophages, and stimulates the proliferation and activation of many cell types, including neutrophils, macrophages, eosinophils, and dendritic cells [75,76]. Therefore, GM-CSF treatment increases numbers of tissue macrophages, circulating monocytes, neutrophils, and platelets, as well as eosinophils [77,78].

After allo-SCT, GM-CSF administration is considered safe [79]. In a prospective multicenter randomized phase IV clinical trial, 206 allogeneic stem cell patients were prophylactically administered with either G-CSF or GM-CSF alone, or a combination of both. Although GM-CSF and GM-CSF + G-CSF decreased combined 600-day IFI-related mortality and yeast incidence, no benefit for IA incidence was found [78].

GM-CSF might partly mitigate the effect of certain immunosuppressive drugs but inhibit the ability of the immune system to clear *Aspergillus*. Brummer et al. illustrated that GM-CSF prevents the immunosuppressive effects of dexamethasone on murine bronchoalveolar macrophages, leading to increased killing of *A. fumigatus* conidia [80]. Supportively, GM-CSF exposure lowered the fungal burden in the lung among cyclophosphamide immunosuppressed mice in a model of pulmonary aspergillosis [81]. Macrophage suppression by the corticosteroid cortisone acetate was also inhibited by GM-CSF. This effect lasted for more than a week after treatment in a murine model. In addition, GM-CSF has been shown to counteract corticosteroid-induced downregulation of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , which are crucial to early defense mechanisms of the innate immune system against *Aspergillus* conidia [82].

Even though GM-CSF shortens the time of neutropenia, which is the major risk factor for IA, no benefit concerning incidence or course of IA in larger patient cohorts has been found to date. Again, this demonstrates that addressing one of the many dysfunctions of the immune system after allo-SCT might not be sufficient to prevent or clear IA. However, GM-CSF potential to partly reverse undesired immunosuppressive effects after allo-SCT, which hamper infection control, might be an additional advantage of GM-CSF administration.

3.2. IFN- γ

A strong Th1 response is essential to clear *Aspergillus* [83–85]. In order to increase the Th1 response of patients, FDA-approved forms of IFN- γ might be administered. In vivo, IFN- γ is secreted by T and NK cells. It has the capacity to induce protective responses of the innate and adaptive immune systems against *Aspergillus* [43]. Numerous clinical studies have investigated the benefit of supplementing antifungal therapy with IFN- γ .

Case reports describing the positive effect of adjunctive IFN- γ administration on aspergillosis have been published [86–89]. In a randomized prospective placebo-controlled double-blinded clinical study of 128 patients undergoing chronic granulomatous disease, decreased frequencies of infections were observed after frequent IFN- γ administration compared to controls. However, only one patient in the IFN- γ -treated group and four patients in the placebo group suffered from aspergillosis, which highly limited the predictive value of the study. The study was also limited by the short follow-up period of only 10 months [90]. A case series of IFIs on renal transplant patients included three patients suffering from disseminated IA. All three cases were cured after six weeks of combined amphotericin B and IFN- γ treatment [91]. In a prospective case series of eight patients, including three aspergillosis cases, Delsing et al. showed increased ability of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to produce pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α , Th17-stimulating cytokines IL-17 and IL-22, and heightened HLA-DR expression after combined IFN- γ and antifungal treatment, all of which play an important role in protecting the host from IA. While lymphocyte and monocyte numbers were increased, granulocyte numbers were slightly decreased [92]. In order to reverse the drop in granulocyte numbers, the addition of IFN- γ with a granulocyte count-increasing cytokine such as GM-CSF might be beneficial. Combination therapy of IFN- γ and GM-CSF, supporting antifungal treatment in two HIV-negative and one HIV-positive patient suffering from progressive pulmonary aspergillosis, showed promising results. Peripheral leukocyte numbers increased and Th1 response was strengthened. This resulted in an improved control of the fungal infection [93]. In vitro, pre-incubation of human PMNs with IFN- γ and GM-CSF led to enhanced *Aspergillus flavus* hyphal damage and increased release of oxygen radicals by PMNs. This effect disappeared when pre-incubating PMNs with only either one of the cytokines [94]. Another report demonstrated that IFN- γ treatment of PMNs and PBMCs resulted in increased hyphal damage of *A. fumigatus* [95].

Even though adjunctive IFN- γ treatment has many potential advantages and is well tolerated in allo-SCT patients [96], the evidence supporting the use in patients is still weak [22]. More trials need to be conducted.

3.3. TNF- α

TNF- α is one of the most important cytokines in the defense against *Aspergillus* [97]. Comparable to IFN- γ , addition of TNF- α stimulates PMNs, which in turn increase oxygen radical release and cause enhanced hyphal damage against *A. fumigatus* in vitro. Although intracellular killing of *A. fumigatus* conidia by alveolar macrophages was not increased, phagocytosis was enhanced [98]. Administration of TNF- α to immunosuppressed mice in a model for pulmonary aspergillosis increased survival [99]. A time-dependent increase in TNF- α levels of the lung was correlated with higher migration of PMNs to the lung and increased survival of neutropenic and non-neutropenic mice after challenge with *A. fumigatus* conidia. In turn, blocking of TNF- α resulted in higher mortality and fungal lung burden in neutropenic mice. Prophylactic treatment of neutropenic mice with TNF- α increased their survival [100]. However, the major limitation of using TNF- α in the treatment of aspergillosis is its serious toxicity after systemic administration, including hepatotoxicity, nephrotoxicity, and neurotoxicity [101].

4. Other Immunotherapeutic Approaches

4.1. Vaccination

Successful vaccination elicits an adaptive immune response to a pathogen, leading to the generation of memory cells, which are able to fight subsequent infections with the same pathogen much more efficiently. There are different forms of vaccination available. First of all, inactivated whole-cell vaccines can be used; however, they have known limitations. They are complex and therefore difficult to standardize, and usually only elicit weak immune responses [102]. Live vaccines are more immunogenic, but are considered unsafe in immunocompromised patients, as they can potentially cause disease [103]. Subunit vaccines, which consist of purified elements, in combination with an adjuvant, could be the best method available in order to vaccinate immunocompromised patients, as they are easy to standardize and also considered safe in this cohort [53].

Subcutaneous vaccination using a hyphal sonicate protected immunocompromised mice in a model of IA [104]. The vaccination of mice with heat-killed *S. cerevisiae* before *A. fumigatus* challenge increased survival and decreased fungal organ burden. The major limitation of this study was the usage of immunocompetent mice without any immunosuppression. The usefulness of this approach in an immunocompromised setting cannot be predicted [105]. In another study, mice were vaccinated by intranasal inhalation of either filtrates of viable *A. fumigatus*, viable *A. fumigatus*, or heat-inactivated *A. fumigatus*. Thereafter, mice were immunosuppressed and challenged with the fungus. The filtrate and the live fungus vaccination were able to prolong survival and induced a protective Th1 response. In contrast, no prolonged protection was found in mice vaccinated with heat-inactivated fungus, which provoked a Th2 response [106]. Furthermore, vaccination with recombinant *Aspergillus* antigens Asp f 3, Asp f 9, Asp f 16 (all major allergens), Gel1 (a protein associated with cell wall morphogenesis), and Pep1 (an extracellular endopeptidase) resulted in protective effects in murine models of aspergillosis [107,108]. These antigens could potentially be used as the basis of subunit vaccines. The same is true for mannans, which can be found in the cell wall of *Aspergillus*. Liu et al. vaccinated immunocompetent mice with mannans derived from *C. albicans*, leading to increased survival rates after challenge with *A. fumigatus* conidia. Mortality was further decreased by the addition of bovine serum albumin (BSA) to the mannans [109].

Even though vaccine development in immunocompromised patients is difficult because of their weakened immune system, advances have been made to improve vaccination strategies in this patient cohort. However, T and B cell counts, as well as functionality, have to be at least partially restored in order to elicit a protective response. After allo-SCT, the reconstitution of the adaptive immune system takes several months [110]. Therefore, *Aspergillus* vaccination might not be effective in *Aspergillus* infections early after allo-SCT. It is still difficult and costly to develop vaccines against fungal pathogens, and in contrast to other microbes, no fungal vaccine has been licensed yet. Vaccines for other fungi, such as NDV-3A for *C. albicans*, which was used in a recent promising clinical trial, might lead to increased interest in the development of vaccines for *Aspergillus* [102,111].

4.2. Antibodies

Two decades ago, the humoral response was thought to play little to no role in the defense against fungi. More recent findings, however, show that this dogma needs to be revised. Humoral responses, in fact, are important for the host defense against fungal infection, including *Aspergillus* [112]. Patients with Good syndrome, a disease characterized by hypogammaglobulinemia, show increased incidences of fungal infections, including aspergillosis [113]. Anti-*Aspergillus* antibodies bind to swollen conidia and germ tubes, activating the classical pathway of the complement system. Complement activation leads to the killing of *Aspergillus* by neutrophils [114].

The efficacy of different kinds of antibodies against *Aspergillus* has been evaluated. One approach is to target polysaccharides found on the cell wall of fungi. The monoclonal antibody (mAb) 2G8 targets the cell wall polysaccharide laminarin, which consists of β -glucan. It has demonstrated antifungal effects,

including activity against *A. fumigatus* [115]. A different method is the usage of anti-idiotypic mAbs to yeast killer toxin, found in *Pichia anomala* and *Williopsis mrakii*, which displays antimicrobial effects. Administration of these mAbs to immunocompromised mice infected with *A. fumigatus* decreased fungal growth and increased survival [116]. Radioimmunotherapy has the potential to be another antibody-based immunotherapeutic strategy against *Aspergillus*. In this approach, an antibody directed against the fungus is tagged with radionuclides in order to deliver a lethal dose of radiation to the fungus [117].

The administration of antibodies might strengthen the ability of allo-SCT patients to prevent or clear IA in absence of a fully functional adaptive immune system. In contrast to adoptive T cell or CAR T cell transfer, in which autologous T cells have to be generated for each single patient over the period of weeks, one type of antibody would be instantly available for all affected patients, which might be a major advantage in acute infections. The research on the humoral response against *Aspergillus* and the implementation of immunotherapeutic strategies based on these findings is still in its early stages. However, the initial results generated are promising, and more data should be collected.

5. Summary and Outlook

The treatment of IA patients with standard antifungal drugs faces numerous challenges. No new class of antifungal drugs has been invented for over a decade, the number of fungal isolates resistant to azoles has been steadily increasing, and the side effects of conventional antifungal drugs are still considered to be severe. Immunotherapeutic approaches hold promise for improving antifungal therapy in order to decrease high mortality rates. In general, immunotherapy protocols treating *Aspergillus* infections are still exploratory, cost-intensive, might be accompanied by severe side effects, and involve complex as well as time-intensive genetic and cellular manipulations before use. Different immunotherapeutic strategies have been investigated for their efficacy, safety, and their potential to overcome these challenges. The most promising candidates should be evaluated in well-designed clinical trials. Up to this point, the low prevalence of IA has first resulted in the clinical evaluation of these exploratory methods in small patient cohorts with low statistical power; and second, the analysis of a treatment's efficacy has often been assessed in combined IFIs. Various IFIs are known to differ in their pathology and susceptibility to certain treatments. Thus, multicenter clinical trials for IA should be performed.

There are promising weapons against *Aspergillus* on the horizon. In the future, this fight might involve the use of new NK CAR technology, a tool that can be used as an allogeneic "off-the-shelf" product [118]. It might also include checkpoint inhibitors. These molecules disable inhibiting receptors on immune cells and therefore increase their activity. They have demonstrated their efficacy in cancer research and might attenuate the clinical progression of IA [119]. Another promising approach is the usage of neutrophil-dendritic cell hybrids (PMN-DCs), which are cells with the microbicide function of PMNs and the capacity of DCs to stimulate adaptive immunity [120]. In addition, as drug development is expensive, and only a few drug candidates reach market maturity, the repurposing of approved drugs for potential use in IA might be worthwhile. Drugs such as auranofin and ebselen have shown activity against *Aspergillus* in vitro. Both drugs block the thioredoxin reductase pathway, which is essential for cells to manipulate disulfide bonds. This pathway is different in humans compared to bacteria, as well as fungi, and therefore might be a suitable target [121,122]. Moreover, combining novel immunotherapeutic approaches with antifungals might yield positive synergistic effects. For example, echinocandins are drugs that uncover immunologically active epitopes in the fungal cell wall. Many immunotherapeutic strategies such as D-CARs or β -glucan-specific antibodies target these epitopes, which might result in more efficient fungal clearance [119].

In conclusion, the fight against IA still relies heavily on conventional antifungal drugs. Immunotherapy has made a lot of progress in the last decade and might be used as an adjuvant therapy or even on its own in the future. In order to bring these new treatment strategies to the bedside, well-designed multicenter clinical trials are of the utmost importance.

Author Contributions: C.D.L., H.E., and J.L. wrote the manuscript. C.D.L. designed the figures.

Funding: This work was supported by the Bavarian Ministry of Economics, Media, Energy and Technology (grant number BayBIO-1606-003, “T-cell based diagnostic monitoring of invasive aspergillosis in haematological patients”) and the “Deutsche Forschungsgemeinschaft” (Collaborative Research Center / Transregio 124 “Pathogenic fungi and their human host: Networks of interaction – FungiNet”, [project A2 to HE and JL].

Acknowledgments: We thank Lukas Page for proofreading the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Taccone, F.S.; Van den Abeele, A.M.; Bulpa, P.; Misset, B.; Meersseman, W.; Cardoso, T.; Paiva, J.A.; Blasco-Navalpotro, M.; De Laere, E.; Dimopoulos, G.; et al. Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: Clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Crit. Care* **2015**, *19*, 7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Filler, S.G.; Sheppard, D.C. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathog.* **2006**, *2*, e129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. White, P.L.; Posso, R.B.; Barnes, R.A. Analytical and Clinical Evaluation of the PathoNostics AsperGenius Assay for Detection of Invasive Aspergillosis and Resistance to Azole Antifungal Drugs Directly from Plasma Samples. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 2356–2366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hohl, T.M. Immune responses to invasive aspergillosis: New understanding and therapeutic opportunities. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2017**, *30*, 364–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Aimanianda, V.; Bayry, J.; Bozza, S.; Kniemeyer, O.; Perruccio, K.; Elluru, S.R.; Clavaud, C.; Paris, S.; Brakhage, A.A.; Kaveri, S.V.; et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* **2009**, *460*, 1117–1121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Bidula, S.; Schelenz, S. A Sweet Response to a Sour Situation: The Role of Soluble Pattern Recognition Receptors in the Innate Immune Response to Invasive *Aspergillus fumigatus* Infections. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005637. [[CrossRef](#)]
7. Garth, J.M.; Reeder, K.M.; Godwin, M.S.; Mackel, J.J.; Dunaway, C.W.; Blackburn, J.P.; Steele, C. IL-33 Signaling Regulates Innate IL-17A and IL-22 Production via Suppression of Prostaglandin E₂ during Lung Fungal Infection. *J. Immunol.* **2017**. [[CrossRef](#)]
8. Espinosa, V.; Rivera, A. First line of defense: Innate cell-mediated control of pulmonary aspergillosis. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 272. [[CrossRef](#)]
9. Khanna, N.; Stuehler, C.; Lünemann, A.; Wójtowicz, A.; Bochud, P.Y.; Leibundgut-Landmann, S. Host response to fungal infections—How immunology and host genetics could help to identify and treat patients at risk. *Swiss Med. Wkly.* **2016**, *146*. [[CrossRef](#)]
10. Heinz, W.J.; Vehreschild, J.J.; Buchheidt, D. Diagnostic workout to assess early response indicators in invasive pulmonary aspergillosis in adult patients with hematologic malignancies. *Mycoses* **2018**. [[CrossRef](#)]
11. Leroux, S.; Ullmann, A.J. Management and diagnostic guidelines for fungal diseases in infectious diseases and clinical microbiology: Critical appraisal. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 1115–1121. [[CrossRef](#)]
12. Chowdhary, A.; Sharma, C.; Meis, J.F. Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, S436–S444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Hickey, M.J.; Kubes, P. Intravascular immunity: The host-pathogen encounter in blood vessels. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 364–375. [[CrossRef](#)]
14. Shoham, S.; Levitz, S.M. The immune response to fungal infections. *Br. J. Haematol.* **2005**, *129*, 569–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hubel, K.; Carter, R.A.; Liles, W.C.; Dale, D.C.; Price, T.H.; Bowden, R.A.; Rowley, S.D.; Chauncey, T.R.; Bensing, W.I.; Boeckh, M. Granulocyte transfusion therapy for infections in candidates and recipients of HPC transplantation: A comparative analysis of feasibility and outcome for community donors versus related donors. *Transfusion* **2002**, *42*, 1414–1421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Price, T.H.; Bowden, R.A.; Boeckh, M.; Bux, J.; Nelson, K.; Liles, W.C.; Dale, D.C. Phase I/II trial of neutrophil transfusions from donors stimulated with G-CSF and dexamethasone for treatment of patients with infections in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **2000**, *95*, 3302–3309. [[PubMed](#)]

17. Seidel, M.G.; Peters, C.; Wacker, A.; Northoff, H.; Moog, R.; Boehme, A.; Silling, G.; Grimminger, W.; Einsele, H. Randomized phase III study of granulocyte transfusions in neutropenic patients. *Bone Marrow Transplant.* **2008**, *42*, 679–684. [[CrossRef](#)]
18. Mousset, S.; Hermann, S.; Klein, S.A.; Bialleck, H.; Duchscherer, M.; Bomke, B.; Wassmann, B.; Bohme, A.; Hoelzer, D.; Martin, H. Prophylactic and interventional granulocyte transfusions in patients with haematological malignancies and life-threatening infections during neutropenia. *Ann. Hematol.* **2005**, *84*, 734–741. [[CrossRef](#)]
19. Price, T.H.; Boeckh, M.; Harrison, R.W.; McCullough, J.; Ness, P.M.; Strauss, R.G.; Nichols, W.G.; Hamza, T.H.; Cushing, M.M.; King, K.E.; et al. Efficacy of transfusion with granulocytes from G-CSF/dexamethasone-treated donors in neutropenic patients with infection. *Blood* **2015**, *126*, 2153–2161. [[CrossRef](#)]
20. BitMansour, A.; Burns, S.M.; Traver, D.; Akashi, K.; Contag, C.H.; Weissman, I.L.; Brown, J.M. Myeloid progenitors protect against invasive aspergillosis and *Pseudomonas aeruginosa* infection following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **2002**, *100*, 4660–4667. [[CrossRef](#)]
21. BitMansour, A.; Cao, T.M.; Chao, S.; Shashidhar, S.; Brown, J.M. Single infusion of myeloid progenitors reduces death from *Aspergillus fumigatus* following chemotherapy-induced neutropenia. *Blood* **2005**, *105*, 3535–3537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Patterson, T.F.; Thompson, G.R., 3rd; Denning, D.W.; Fishman, J.A.; Hadley, S.; Herbrecht, R.; Kontoyannis, D.P.; Marr, K.A.; Morrison, V.A.; Nguyen, M.H.; et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *63*, e1–e60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ramirez-Ortiz, Z.G.; Means, T.K. The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi (*A. fumigatus*, *C. neoformans* and *C. albicans*). *Virulence* **2012**, *3*, 635–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Thakur, R.; Anand, R.; Tiwari, S.; Singh, A.P.; Tiwary, B.N.; Shankar, J. Cytokines induce effector T-helper cells during invasive aspergillosis; what we have learned about T-helper cells? *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zelante, T.; Wong, A.Y.; Ping, T.J.; Chen, J.; Sumatoh, H.R.; Vigano, E.; Hong Bing, Y.; Lee, B.; Zolezzi, F.; Fric, J.; et al. CD103(+) Dendritic Cells Control Th17 Cell Function in the Lung. *Cell Rep.* **2015**, *12*, 1789–1801. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bozza, S.; Gaziano, R.; Lipford, G.B.; Montagnoli, C.; Bacci, A.; Di Francesco, P.; Kurup, V.P.; Wagner, H.; Romani, L. Vaccination of mice against invasive aspergillosis with recombinant *Aspergillus* proteins and CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Microbes Infect.* **2002**, *4*, 1281–1290. [[CrossRef](#)]
27. Bozza, S.; Perruccio, K.; Montagnoli, C.; Gaziano, R.; Bellocchio, S.; Burchielli, E.; Nkwanyuo, G.; Pitzurra, L.; Velardi, A.; Romani, L. A dendritic cell vaccine against invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic transplantation. *Blood* **2003**, *102*, 3807–3814. [[CrossRef](#)]
28. Shao, H.J.; Chen, L.; Su, Y.B. DNA fragment encoding human IL-1beta 163-171 peptide enhances the immune responses elicited in mice by DNA vaccine against foot-and-mouth disease. *Vet. Res. Commun.* **2005**, *29*, 35–46. [[CrossRef](#)]
29. Zhu, F.; Ramadan, G.; Davies, B.; Margolis, D.A.; Keverer-Taylor, C.A. Stimulation by means of dendritic cells followed by Epstein-Barr virus-transformed B cells as antigen-presenting cells is more efficient than dendritic cells alone in inducing *Aspergillus* f16-specific cytotoxic T cell responses. *Clin. Exp. Immunol.* **2008**, *151*, 284–296. [[CrossRef](#)]
30. Roy, R.M.; Klein, B.S. Dendritic cells in antifungal immunity and vaccine design. *Cell Host Microbe* **2012**, *11*, 436–446. [[CrossRef](#)]
31. Schmidt, S.; Tramsen, L.; Perkhofer, S.; Lass-Flörl, C.; Hanisch, M.; Roger, F.; Klingebiel, T.; Koehl, U.; Lehrnbecher, T. *Rhizopus oryzae* hyphae are damaged by human natural killer (NK) cells, but suppress NK cell mediated immunity. *Immunobiology* **2013**, *218*, 939–944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Schmidt, S.; Tramsen, L.; Lehrnbecher, T. Natural Killer Cells in Antifungal Immunity. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ziegler, S.; Weiss, E.; Schmitt, A.L.; Schlegel, J.; Burgert, A.; Terpitz, U.; Sauer, M.; Moretta, L.; Sivori, S.; Leonhardt, I.; et al. CD56 Is a Pathogen Recognition Receptor on Human Natural Killer Cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Schmidt, S.; Tramsen, L.; Hanisch, M.; Latge, J.P.; Huenecke, S.; Koehl, U.; Lehrnbecher, T. Human natural killer cells exhibit direct activity against *Aspergillus fumigatus* hyphae, but not against resting conidia. *J. Infect. Dis.* **2011**, *203*, 430–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Stuehler, C.; Kuenzli, E.; Jaeger, V.K.; Baettig, V.; Ferracin, F.; Rajacic, Z.; Kaiser, D.; Bernardini, C.; Forrer, P.; Weisser, M.; et al. Immune Reconstitution After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Association With Occurrence and Outcome of Invasive Aspergillosis. *J. Infect. Dis.* **2015**, *212*, 959–967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Park, S.J.; Hughes, M.A.; Burdick, M.; Strieter, R.M.; Mehrad, B. Early NK cell-derived IFN- γ is essential to host defense in neutropenic invasive aspergillosis. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 4306–4312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Benedetto, N.; Sabatini, P.; Sellitto, C.; Romano Carratelli, C. Interleukin-2 and increased natural killer activity in mice experimentally infected with *Aspergillus niger*. *Microbiologica* **1988**, *11*, 339–345.
38. Tonn, T.; Schwabe, D.; Klingemann, H.G.; Becker, S.; Esser, R.; Koehl, U.; Suttrop, M.; Seifried, E.; Ottmann, O.G.; Bug, G. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy* **2013**, *15*, 1563–1570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Arai, S.; Meagher, R.; Swearingen, M.; Myint, H.; Rich, E.; Martinson, J.; Klingemann, H. Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: A phase I trial. *Cytotherapy* **2008**, *10*, 625–632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Boyiadzis, M.; Agha, M.; Redner, R.L.; Sehgal, A.; Im, A.; Hou, J.Z.; Farah, R.; Dorritie, K.A.; Raptis, A.; Lim, S.H.; et al. Phase 1 clinical trial of adoptive immunotherapy using “off-the-shelf” activated natural killer cells in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia. *Cytotherapy* **2017**, *19*, 1225–1232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Klingemann, H.; Grodman, C.; Cutler, E.; Duque, M.; Kadidlo, D.; Klein, A.K.; Sprague, K.A.; Miller, K.B.; Comenzo, R.L.; Kewalramani, T.; et al. Autologous stem cell transplant recipients tolerate haploidentical related-donor natural killer cell-enriched infusions. *Transfusion* **2013**, *53*, 412–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Shah, N.; Li, L.; McCarty, J.; Kaur, I.; Yvon, E.; Shaim, H.; Muftuoglu, M.; Liu, E.; Orlowski, R.Z.; Cooper, L.; et al. Phase I study of cord blood-derived natural killer cells combined with autologous stem cell transplantation in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **2017**, *177*, 457–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dewi, I.; van de Veerdonk, F.; Gresnigt, M. The Multifaceted Role of T-Helper Responses in Host Defense against *Aspergillus fumigatus*. *J. Fungi* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Perruccio, K.; Tosti, A.; Burchielli, E.; Topini, F.; Ruggeri, L.; Carotti, A.; Capanni, M.; Urbani, E.; Mancusi, A.; Aversa, F.; et al. Transferring functional immune responses to pathogens after haploidentical hematopoietic transplantation. *Blood* **2005**, *106*, 4397–4406. [[CrossRef](#)]
45. Papadopoulou, A.; Kaloyannidis, P.; Yannaki, E.; Cruz, C.R. Adoptive transfer of *Aspergillus*-specific T cells as a novel anti-fungal therapy for hematopoietic stem cell transplant recipients: Progress and challenges. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, *98*, 62–72. [[CrossRef](#)]
46. Tramsen, L.; Koehl, U.; Tonn, T.; Latge, J.P.; Schuster, F.R.; Borkhardt, A.; Uharek, L.; Quaritsch, R.; Beck, O.; Seifried, E.; et al. Clinical-scale generation of human anti-*Aspergillus* T cells for adoptive immunotherapy. *Bone Marrow Transplant.* **2009**, *43*, 13–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Tramsen, L.; Schmidt, S.; Boenig, H.; Latge, J.P.; Lass-Flörl, C.; Roeger, F.; Seifried, E.; Klingebiel, T.; Lehrnbecher, T. Clinical-scale generation of multi-specific anti-fungal T cells targeting *Candida*, *Aspergillus* and mucormycetes. *Cytotherapy* **2013**, *15*, 344–351. [[CrossRef](#)]
48. Khanna, N.; Stuehler, C.; Conrad, B.; Lurati, S.; Krappmann, S.; Einsele, H.; Berges, C.; Topp, M.S. Generation of a multipathogen-specific T-cell product for adoptive immunotherapy based on activation-dependent expression of CD154. *Blood* **2011**, *118*, 1121–1131. [[CrossRef](#)]
49. Stuehler, C.; Nowakowska, J.; Bernardini, C.; Topp, M.S.; Battegay, M.; Passweg, J.; Khanna, N. Multispecific *Aspergillus* T cells selected by CD137 or CD154 induce protective immune responses against the most relevant mold infections. *J. Infect. Dis.* **2015**, *211*, 1251–1261. [[CrossRef](#)]
50. Bacher, P.; Jochheim-Richter, A.; Mockel-Tenbrink, N.; Kniemeyer, O.; Wingenfeld, E.; Alex, R.; Ortigao, A.; Karpova, D.; Lehrnbecher, T.; Ullmann, A.J.; et al. Clinical-scale isolation of the total *Aspergillus fumigatus*-reactive T-helper cell repertoire for adoptive transfer. *Cytotherapy* **2015**, *17*, 1396–1405. [[CrossRef](#)]

51. Tramsen, L.; Schmidt, S.; Roeger, F.; Schubert, R.; Salzmänn-Manrique, E.; Latge, J.P.; Klingebiel, T.; Lehrnbecher, T. Immunosuppressive compounds exhibit particular effects on functional properties of human anti-Aspergillus Th1 cells. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 2649–2656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Tzannou, I.; Papadopoulou, A.; Naik, S.; Leung, K.; Martinez, C.A.; Ramos, C.A.; Carrum, G.; Sasa, G.; Lulla, P.; Watanabe, A.; et al. Off-the-Shelf Virus-Specific T Cells to Treat BK Virus, Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 3547–3557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Iannitti, R.G.; Carvalho, A.; Romani, L. From memory to antifungal vaccine design. *Trends Immunol.* **2012**, *33*, 467–474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Cutler, J.E.; Deepe, G.S., Jr.; Klein, B.S. Advances in combating fungal diseases: Vaccines on the threshold. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 13–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Sun, Z.; Zhu, P.; Li, L.; Wan, Z.; Zhao, Z.; Li, R. Adoptive immunity mediated by HLA-A*0201 restricted Asp f16 peptides-specific CD8+ T cells against Aspergillus fumigatus infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **2012**, *31*, 3089–3096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Maldini, C.R.; Ellis, G.I.; Riley, J.L. CAR T cells for infection, autoimmunity and allotransplantation. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 605–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Zheng, P.-P.; Kros, J.M.; Li, J. Approved CAR T cell therapies: Ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts. *Drug Discov. Today* **2018**, *23*, 1175–1182. [[CrossRef](#)]
58. Johnson, L.A.; June, C.H. Driving gene-engineered T cell immunotherapy of cancer. *Cell Res.* **2017**, *27*, 38–58. [[CrossRef](#)]
59. Dotti, G.; Gottschalk, S.; Savoldo, B.; Brenner, M.K. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol. Rev.* **2014**, *257*, 107–126. [[CrossRef](#)]
60. Kumaresan, P.R.; Silva, T.; Kontoyiannis, D.P. Methods of Controlling Invasive Fungal Infections Using CD8+ T Cells. *Front. Immunol.* **2018**, *8*, 1939. [[CrossRef](#)]
61. Bridgeman, J.S.; Hawkins, R.E.; Bagley, S.; Blaylock, M.; Holland, M.; Gilham, D.E. The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 6938–6949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Abken, H. Costimulation Engages the Gear in Driving CARs. *Immunity* **2016**, *44*, 214–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Kumaresan, P.R.; Manuri, P.R.; Albert, N.D.; Maiti, S.; Singh, H.; Mi, T.; Roszik, J.; Rabinovich, B.; Olivares, S.; Krishnamurthy, J.; et al. Bioengineering T cells to target carbohydrate to treat opportunistic fungal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 10660–10665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Singh, H.; Manuri, P.R.; Olivares, S.; Dara, N.; Dawson, M.J.; Huls, H.; Hackett, P.B.; Kohn, D.B.; Shpall, E.J.; Champlin, R.E.; et al. Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2961–2971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Wright, C.R.; Ward, A.C.; Russell, A.P. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Its Potential Application for Skeletal Muscle Repair and Regeneration. *Mediat. Inflamm.* **2017**, *2017*, 7517350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Clark, O.A.; Lyman, G.H.; Castro, A.A.; Clark, L.G.; Djulbegovic, B. Colony-stimulating factors for chemotherapy-induced febrile neutropenia: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 4198–4214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Sionov, E.; Mendlovic, S.; Segal, E. Experimental systemic murine aspergillosis: Treatment with polyene and caspofungin combination and G-CSF. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *56*, 594–597. [[CrossRef](#)]
68. Liles, W.C.; Huang, J.E.; van Burik, J.A.; Bowden, R.A.; Dale, D.C. Granulocyte colony-stimulating factor administered in vivo augments neutrophil-mediated activity against opportunistic fungal pathogens. *J. Infect. Dis.* **1997**, *175*, 1012–1015. [[CrossRef](#)]
69. Smith, T.J.; Khatcheressian, J.; Lyman, G.H.; Ozer, H.; Armitage, J.O.; Balducci, L.; Bennett, C.L.; Cantor, S.B.; Crawford, J.; Cross, S.J.; et al. 2006 update of recommendations for the use of white blood cell growth factors: An evidence-based clinical practice guideline. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 3187–3205. [[CrossRef](#)]
70. Ringden, O.; Labopin, M.; Gorin, N.C.; Le Blanc, K.; Rocha, V.; Gluckman, E.; Reiffers, J.; Arcese, W.; Vossen, J.M.; Jouet, J.P.; et al. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor after allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia increases the risk of graft-versus-host disease and death: A study

51. Tramsen, L.; Schmidt, S.; Roeger, F.; Schubert, R.; Salzmann-Manrique, E.; Latge, J.P.; Klingebiel, T.; Lehrnbecher, T. Immunosuppressive compounds exhibit particular effects on functional properties of human anti-Aspergillus Th1 cells. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 2649–2656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Tzannou, I.; Papadopoulou, A.; Naik, S.; Leung, K.; Martinez, C.A.; Ramos, C.A.; Carrum, G.; Sasa, G.; Lulla, P.; Watanabe, A.; et al. Off-the-Shelf Virus-Specific T Cells to Treat BK Virus, Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 3547–3557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Iannitti, R.G.; Carvalho, A.; Romani, L. From memory to antifungal vaccine design. *Trends Immunol.* **2012**, *33*, 467–474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Cutler, J.E.; Deepe, G.S., Jr.; Klein, B.S. Advances in combating fungal diseases: Vaccines on the threshold. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 13–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Sun, Z.; Zhu, P.; Li, L.; Wan, Z.; Zhao, Z.; Li, R. Adoptive immunity mediated by HLA-A*0201 restricted Asp f16 peptides-specific CD8+ T cells against Aspergillus fumigatus infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **2012**, *31*, 3089–3096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Maldini, C.R.; Ellis, G.I.; Riley, J.L. CAR T cells for infection, autoimmunity and allotransplantation. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 605–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Zheng, P.-P.; Kros, J.M.; Li, J. Approved CAR T cell therapies: Ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts. *Drug Discov. Today* **2018**, *23*, 1175–1182. [[CrossRef](#)]
58. Johnson, L.A.; June, C.H. Driving gene-engineered T cell immunotherapy of cancer. *Cell Res.* **2017**, *27*, 38–58. [[CrossRef](#)]
59. Dotti, G.; Gottschalk, S.; Savoldo, B.; Brenner, M.K. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol. Rev.* **2014**, *257*, 107–126. [[CrossRef](#)]
60. Kumaresan, P.R.; Silva, T.; Kontoyiannis, D.P. Methods of Controlling Invasive Fungal Infections Using CD8+ T Cells. *Front. Immunol.* **2018**, *8*, 1939. [[CrossRef](#)]
61. Bridgeman, J.S.; Hawkins, R.E.; Bagley, S.; Blaylock, M.; Holland, M.; Gilham, D.E. The optimal antigen response of chimeric antigen receptors harboring the CD3zeta transmembrane domain is dependent upon incorporation of the receptor into the endogenous TCR/CD3 complex. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 6938–6949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Abken, H. Costimulation Engages the Gear in Driving CARs. *Immunity* **2016**, *44*, 214–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Kumaresan, P.R.; Manuri, P.R.; Albert, N.D.; Maiti, S.; Singh, H.; Mi, T.; Roszik, J.; Rabinovich, B.; Olivares, S.; Krishnamurthy, J.; et al. Bioengineering T cells to target carbohydrate to treat opportunistic fungal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 10660–10665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Singh, H.; Manuri, P.R.; Olivares, S.; Dara, N.; Dawson, M.J.; Huls, H.; Hackett, P.B.; Kohn, D.B.; Shpall, E.J.; Champlin, R.E.; et al. Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2961–2971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Wright, C.R.; Ward, A.C.; Russell, A.P. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Its Potential Application for Skeletal Muscle Repair and Regeneration. *Mediat. Inflamm.* **2017**, *2017*, 7517350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Clark, O.A.; Lyman, G.H.; Castro, A.A.; Clark, L.G.; Djulbegovic, B. Colony-stimulating factors for chemotherapy-induced febrile neutropenia: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 4198–4214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Sionov, E.; Mendlovic, S.; Segal, E. Experimental systemic murine aspergillosis: Treatment with polyene and caspofungin combination and G-CSF. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *56*, 594–597. [[CrossRef](#)]
68. Liles, W.C.; Huang, J.E.; van Burik, J.A.; Bowden, R.A.; Dale, D.C. Granulocyte colony-stimulating factor administered in vivo augments neutrophil-mediated activity against opportunistic fungal pathogens. *J. Infect. Dis.* **1997**, *175*, 1012–1015. [[CrossRef](#)]
69. Smith, T.J.; Khatcheressian, J.; Lyman, G.H.; Ozer, H.; Armitage, J.O.; Balducci, L.; Bennett, C.L.; Cantor, S.B.; Crawford, J.; Cross, S.J.; et al. 2006 update of recommendations for the use of white blood cell growth factors: An evidence-based clinical practice guideline. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 3187–3205. [[CrossRef](#)]
70. Ringden, O.; Labopin, M.; Gorin, N.C.; Le Blanc, K.; Rocha, V.; Gluckman, E.; Reiffers, J.; Arcese, W.; Vossen, J.M.; Jouet, J.P.; et al. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor after allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia increases the risk of graft-versus-host disease and death: A study

- from the Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J. Clin. Oncol.* **2004**, *22*, 416–423. [\[CrossRef\]](#)
71. Hume, D.A.; MacDonald, K.P. Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood* **2012**, *119*, 1810–1820. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 72. Nemunaitis, J.; Shannon-Dorcy, K.; Appelbaum, F.R.; Meyers, J.; Owens, A.; Day, R.; Ando, D.; O'Neill, C.; Buckner, D.; Singer, J. Long-term follow-up of patients with invasive fungal disease who received adjunctive therapy with recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **1993**, *82*, 1422–1427. [\[PubMed\]](#)
 73. Kandalla, P.K.; Sarrazin, S.; Molawi, K.; Berruyer, C.; Redelberger, D.; Favel, A.; Bordi, C.; de Bentzmann, S.; Sieweke, M.H. M-CSF improves protection against bacterial and fungal infections after hematopoietic stem/progenitor cell transplantation. *J. Exp. Med.* **2016**, *213*, 2269–2279. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 74. Gonzalez, C.E.; Lyman, C.A.; Lee, S.; Del Guercio, C.; Roilides, E.; Bacher, J.; Gehrt, A.; Feuerstein, E.; Tsokos, M.; Walsh, T.J. Recombinant human macrophage colony-stimulating factor augments pulmonary host defences against *Aspergillus fumigatus*. *Cytokine* **2001**, *15*, 87–95. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 75. Shiomi, A.; Usui, T. Pivotal roles of GM-CSF in autoimmunity and inflammation. *Mediat. Inflamm.* **2015**, *2015*, 568543. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 76. Scriven, J.E.; Tenforde, M.W.; Levitz, S.M.; Jarvis, J.N. Modulating host immune responses to fight invasive fungal infections. *Curr. Opin. Microbiol.* **2017**, *40*, 95–103. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 77. Ruef, C.; Coleman, D.L. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Pleiotropic cytokine with potential clinical usefulness. *Rev. Infect. Dis.* **1990**, *12*, 41–62. [\[CrossRef\]](#)
 78. Wan, L.; Zhang, Y.; Lai, Y.; Jiang, M.; Song, Y.; Zhou, J.; Zhang, Z.; Duan, X.; Fu, Y.; Liao, L.; et al. Effect of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor on Prevention and Treatment of Invasive Fungal Disease in Recipients of Allogeneic Stem-Cell Transplantation: A Prospective Multicenter Randomized Phase IV Trial. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 3999–4006. [\[CrossRef\]](#)
 79. Safdar, A.; Rodriguez, G.; Zuniga, J.; Al Akhrass, F.; Georgescu, G.; Pande, A. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor in 66 patients with myeloid or lymphoid neoplasms and recipients of hematopoietic stem cell transplantation with invasive fungal disease. *Acta Haematol.* **2013**, *129*, 26–34. [\[CrossRef\]](#)
 80. Brummer, E.; Maqbool, A.; Stevens, D.A. In vivo GM-CSF prevents dexamethasone suppression of killing of *Aspergillus fumigatus* conidia by bronchoalveolar macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **2001**, *70*, 868–872.
 81. Quezada, G.; Koshkina, N.V.; Zweidler-McKay, P.; Zhou, Z.; Kontoyiannis, D.P.; Kleinerman, E.S. Intranasal granulocyte-macrophage colony-stimulating factor reduces the *Aspergillus* burden in an immunosuppressed murine model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 716–718. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 82. Brummer, E.; Kamberi, M.; Stevens, D.A. Regulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and/or steroids given in vivo of proinflammatory cytokine and chemokine production by bronchoalveolar macrophages in response to *Aspergillus* conidia. *J. Infect. Dis.* **2003**, *187*, 705–709. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 83. Cenci, E.; Mencacci, A.; Fe d'Ostiani, C.; Del Sero, G.; Mosci, P.; Montagnoli, C.; Bacci, A.; Romani, L. Cytokine- and T helper-dependent lung mucosal immunity in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J. Infect. Dis.* **1998**, *178*, 1750–1760. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 84. Brieland, J.K.; Jackson, C.; Menzel, F.; Loebenberg, D.; Cacciapuoti, A.; Halpern, J.; Hurst, S.; Muchamuel, T.; Debets, R.; Kastelein, R.; et al. Cytokine networking in lungs of immunocompetent mice in response to inhaled *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 1554–1560. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 85. Chai, L.Y.; van de Veerdonk, F.; Marijnissen, R.J.; Cheng, S.C.; Khoo, A.L.; Hectors, M.; Lagrou, K.; Vonk, A.G.; Maertens, J.; Joosten, L.A.; et al. Anti-*Aspergillus* human host defence relies on type 1 T helper (Th1), rather than type 17 T helper (Th17), cellular immunity. *Immunology* **2010**, *130*, 46–54. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 86. Estrada, C.; Desai, A.G.; Chirch, L.M.; Suh, H.; Seidman, R.; Darras, F.; Nord, E.P. Invasive aspergillosis in a renal transplant recipient successfully treated with interferon-gamma. *Case Rep. Transplant.* **2012**, *2012*, 493758. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
 87. Mezidi, M.; Belafia, F.; Nougaret, S.; Pageaux, G.P.; Conseil, M.; Panaro, F.; Boniface, G.; Morquin, D.; Jaber, S.; Jung, B. Interferon gamma in association with immunosuppressive drugs withdrawal and antifungal combination as a rescue therapy for cerebral invasive *Aspergillus* in a liver transplant recipient. *Minerva Anesthesiol.* **2014**, *80*, 1359–1360. [\[PubMed\]](#)

88. Ellis, M.; Watson, R.; McNabb, A.; Lukic, M.L.; Nork, M. Massive intracerebral aspergillosis responding to combination high dose liposomal amphotericin B and cytokine therapy without surgery. *J. Med. Microbiol.* **2002**, *51*, 70–75. [[CrossRef](#)]
89. Kelleher, P.; Goodsall, A.; Mulgirigama, A.; Kunst, H.; Henderson, D.C.; Wilson, R.; Newman-Taylor, A.; Levin, M. Interferon-gamma therapy in two patients with progressive chronic pulmonary aspergillosis. *Eur. Respir. J.* **2006**, *27*, 1307–1310. [[CrossRef](#)]
90. The International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group. A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *324*, 509–516. [[CrossRef](#)]
91. Armstrong-James, D.; Teo, I.A.; Shrivastava, S.; Petrou, M.A.; Taube, D.; Dorling, A.; Shaunak, S. Exogenous interferon-gamma immunotherapy for invasive fungal infections in kidney transplant patients. *Am. J. Transplant.* **2010**, *10*, 1796–1803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Delsing, C.E.; Gresnigt, M.S.; Leentjens, J.; Preijers, F.; Frager, F.A.; Kox, M.; Monneret, G.; Venet, F.; Bleeker-Rovers, C.P.; van de Veerdonk, F.L.; et al. Interferon-gamma as adjunctive immunotherapy for invasive fungal infections: A case series. *BMC Infect. Dis.* **2014**, *14*, 166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Bandera, A.; Trabattoni, D.; Ferrario, G.; Cesari, M.; Franzetti, F.; Clerici, M.; Gori, A. Interferon-gamma and granulocyte-macrophage colony stimulating factor therapy in three patients with pulmonary aspergillosis. *Infection* **2008**, *36*, 368–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Gil-Lamaignere, C.; Winn, R.M.; Simitopoulou, M.; Maloukou, A.; Walsh, T.J.; Roilides, E. Interferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augment the antifungal activity of human polymorphonuclear leukocytes against *Scedosporium* spp.: Comparison with *Aspergillus* spp. *Med. Mycol.* **2005**, *43*, 253–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Gaviria, J.M.; van Burik, J.A.; Dale, D.C.; Root, R.K.; Liles, W.C. Comparison of interferon-gamma, granulocyte colony-stimulating factor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for priming leukocyte-mediated hyphal damage of opportunistic fungal pathogens. *J. Infect. Dis.* **1999**, *179*, 1038–1041. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Safdar, A.; Rodriguez, G.; Ohmagari, N.; Kontoyiannis, D.P.; Rolston, K.V.; Raad, I.I.; Champlin, R.E. The safety of interferon-gamma-1b therapy for invasive fungal infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer* **2005**, *103*, 731–739. [[CrossRef](#)]
97. Sainz, J.; Perez, E.; Hassan, L.; Moratalla, A.; Romero, A.; Collado, M.D.; Jurado, M. Variable number of tandem repeats of TNF receptor type 2 promoter as genetic biomarker of susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis. *Hum. Immunol.* **2007**, *68*, 41–50. [[CrossRef](#)]
98. Roilides, E.; Dimitriadou-Georgiadou, A.; Sein, T.; Kaditsoglou, I.; Walsh, T.J. Tumor necrosis factor alpha enhances antifungal activities of polymorphonuclear and mononuclear phagocytes against *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 5999–6003.
99. Nagai, H.; Guo, J.; Choi, H.; Kurup, V. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha protect mice from invasive aspergillosis. *J. Infect. Dis.* **1995**, *172*, 1554–1560. [[CrossRef](#)]
100. Mehrad, B.; Strieter, R.M.; Standiford, T.J. Role of TNF-alpha in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 1633–1640.
101. Roberts, N.J.; Zhou, S.; Diaz, L.A., Jr.; Holdhoff, M. Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. *Oncotarget* **2011**, *2*, 739–751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Pikman, R.; Ben-Ami, R. Immune modulators as adjuncts for the prevention and treatment of invasive fungal infections. *Immunotherapy* **2012**, *4*, 1869–1882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Cassone, A.; Casadevall, A. Recent progress in vaccines against fungal diseases. *Curr. Opin. Microbiol.* **2012**, *15*, 427–433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Ito, J.I.; Lyons, J.M. Vaccination of corticosteroid immunosuppressed mice against invasive pulmonary aspergillosis. *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 869–871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Liu, M.; Capilla, J.; Johansen, M.E.; Alvarado, D.; Martinez, M.; Chen, V.; Clemons, K.V.; Stevens, D.A. *Saccharomyces* as a vaccine against systemic aspergillosis: ‘the friend of man’ a friend again? *J. Med. Microbiol.* **2011**, *60*, 1423–1432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Cenci, E.; Mencacci, A.; Bacci, A.; Bistoni, F.; Kurup, V.P.; Romani, L. T cell vaccination in mice with invasive pulmonary aspergillosis. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 381–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

107. Ito, J.I.; Lyons, J.M.; Hong, T.B.; Tamae, D.; Liu, Y.-K.; Wilczynski, S.P.; Kalkum, M. Vaccinations with recombinant variants of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 3 protect mice against invasive aspergillosis. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 5075–5084. [[CrossRef](#)]
108. Bozza, S.; Clavaud, C.; Giovannini, G.; Fontaine, T.; Beauvais, A.; Sarfati, J.; D'Angelo, C.; Perruccio, K.; Bonifazi, P.; Zagarella, S.; et al. Immune sensing of *Aspergillus fumigatus* proteins, glycolipids, and polysaccharides and the impact on Th immunity and vaccination. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 2407–2414. [[CrossRef](#)]
109. Liu, M.; Machova, E.; Nescakova, Z.; Medovarska, I.; Clemons, K.V.; Martinez, M.; Chen, V.; Bystricky, S.; Stevens, D.A. Vaccination with mannan protects mice against systemic aspergillosis. *Med. Mycol.* **2012**, *50*, 818–828. [[CrossRef](#)]
110. Tomblyn, M.; Chiller, T.; Einsele, H.; Gress, R.; Sepkowitz, K.; Storek, J.; Wingard, J.R.; Young, J.A.; Boeckh, M.J. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: A global perspective. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2009**, *15*, 1143–1238. [[CrossRef](#)]
111. Edwards, J.E., Jr.; Schwartz, M.M.; Schmidt, C.S.; Sobel, J.D.; Nyirjesy, P.; Schodel, F.; Marchus, E.; Lizakowski, M.; DeMontigny, E.A.; Hoeg, J.; et al. A Fungal Immunotherapeutic Vaccine (NDV-3A) for Treatment of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis—A Phase 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clin. Infect. Dis.* **2018**, *66*, 1928–1936. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Casadevall, A.; Pirofski, L.A. Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases. *Cell Host Microbe* **2012**, *11*, 447–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Malphettes, M.; Gerard, L.; Galicier, L.; Boutboul, D.; Asli, B.; Szalat, R.; Perlat, A.; Masseau, A.; Schleinitz, N.; Le Guenno, G.; et al. Good syndrome: An adult-onset immunodeficiency remarkable for its high incidence of invasive infections and autoimmune complications. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *61*, e13–e19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Braem, S.G.; Rooijackers, S.H.; van Kessel, K.P.; de Cock, H.; Wosten, H.A.; van Strijp, J.A.; Haas, P.J. Effective Neutrophil Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* Is Mediated by Classical Pathway Complement Activation. *J. Innate Immun.* **2015**, *7*, 364–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Torosantucci, A.; Chiani, P.; Bromuro, C.; De Bernardis, F.; Palma, A.S.; Liu, Y.; Mignogna, G.; Maras, B.; Colone, M.; Stringaro, A.; et al. Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e5392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Cenci, E.; Mencacci, A.; Spreca, A.; Montagnoli, C.; Bacci, A.; Perruccio, K.; Velardi, A.; Magliani, W.; Conti, S.; Polonelli, L.; et al. Protection of killer antiidiotypic antibodies against early invasive aspergillosis in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 2375–2382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Nosanchuk, J.D.; Dadachova, E. Radioimmunotherapy of fungal diseases: The therapeutic potential of cytotoxic radiation delivered by antibody targeting fungal cell surface antigens. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 283. [[CrossRef](#)]
118. Rezvani, K.; Rouce, R.; Liu, E.; Shpall, E. Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2017**, *25*, 1769–1781. [[CrossRef](#)]
119. Daver, N.; Kontoyannis, D.P. Checkpoint inhibitors and aspergillosis in AML: The double hit hypothesis. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 1571–1573. [[CrossRef](#)]
120. Fites, J.S.; Gui, M.; Kernien, J.F.; Negoro, P.; Dagher, Z.; Sykes, D.B.; Nett, J.E.; Mansour, M.K.; Klein, B.S. An unappreciated role for neutrophil-DC hybrids in immunity to invasive fungal infections. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1007073. [[CrossRef](#)]
121. Ngo, H.X.; Shrestha, S.K.; Garneau-Tsodikova, S. Identification of Ebsulfur Analogues with Broad-Spectrum Antifungal Activity. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 1507–1516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Wiederhold, N.P.; Patterson, T.F.; Srinivasan, A.; Chaturvedi, A.K.; Fothergill, A.W.; Wormley, F.L.; Ramasubramanian, A.K.; Lopez-Ribot, J.L. Repurposing auranofin as an antifungal: In vitro activity against a variety of medically important fungi. *Virulence* **2017**, *8*, 138–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



6.2 Probandenerfassungsbogen

ENTWICKLUNG UND OPTIMIERUNG EINES
VOLLBLUT-BASIERTEN VERFAHRENS ZUM
NACHWEIS PILZ-SPEZIFISCHER T-ZELLEN



PROBANDEN- ETIKETT:	DATUM:	ERFASSUNGSBOGEN
		GESUNDER PROBAND

Demografische Angaben	
Alter	
Geschlecht	<input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F

Einschlusskriterien	
Alter zwischen 18 und 75 Jahren	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
Schriftliche Einwilligung vorliegend?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein

Ausschlusskriterien	
Schwangerschaft oder stillende Mütter	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> n/a
Einnahme von Immunsuppressiva oder Immunmodulatoren in den letzten 12 Wochen	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
Einnahme von Antiinfektiva in den letzten 4 Wochen	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
Akuter Infekt	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
Chronische Infektionserkrankung	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
Insulinpflichtiger Diabetes mellitus	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
Vakzinierung in den letzten 4 Wochen	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
Bereits an derselben Versuchsserie dieser Studie teilgenommen	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
Abhängigkeitsverhältnis zum Investigatorenteam oder vulnerable Personengruppe	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> n/a

Versuchsnummer und durchzuführende Analysen (Etiketten):			
EXP.-NR.:			

6.3 Fragebogen zur Erfassung der Schimmelpilzexposition



UPN: PW-				DATUM:	FRAGEBOGEN
UPN: LP-					

Vielen Dank für Ihre Bereitschaft zur Teilnahme an unserer Studie. Um die Messwerte richtig bewerten zu können, wäre es sehr hilfreich, wenn Sie die nachfolgenden Fragen beantworten. Selbstverständlich werden diese Daten streng vertraulich behandelt und werden wie alle anderen Studiendokumente und Messergebnisse in pseudonymisierter Form gespeichert, d. h. diese sind nur dem oben stehenden Code, nicht aber ihrem Namen direkt zuordenbar. Wenn Sie dennoch eine Frage nicht beantworten möchten, können Sie diese selbstverständlich offen lassen.

Beruflicher Hintergrund

Derzeitiger Beruf (die in den letzten 3 Monaten hauptsächlich ausgeübte berufliche Tätigkeit)

Welche der folgenden Angaben treffen auf diese Tätigkeit zu?

- Intensiver Kontakt mit organischen Abfällen
- Intensiver Kontakt zu landwirtschaftlichen Rohstoffen
- Verarbeitung von Holz oder Holzprodukten
- Sanierungs- bzw. Renovierungsarbeiten in Altbauten
- Längerer Aufenthalt in Schimmel-belasteten Räumen inkl. belasteten Büroräumen
- Intensiver Umgang mit Pflanzen, inkl. Topfpflanzen und Hydrokultur
- Umgang mit Klimaanlage, Abluftanlagen oder Kühltechnik
- Sonstige Arbeiten, bei denen intensiver Kontakt mit Schimmelpilzen bestanden haben könnte:

Wie lange sind oder waren Sie im zuletzt ausgeübten Beruf beschäftigt? _____ Jahre

Haben Sie in Ihrer beruflichen Karriere jemals Arbeiten ausgeführt, auf welche die folgenden Merkmale zutreffen? Falls ja, wie lange?

- Intensiver Kontakt mit organischen Abfällen (_____ Jahre)
- Intensiver Kontakt zu landwirtschaftlichen Rohstoffen (_____ Jahre)
- Verarbeitung von Holz oder Holzprodukten (_____ Jahre)
- Sanierungs- bzw. Renovierungsarbeiten in Altbauten (_____ Jahre)
- Längerer Aufenthalt in Schimmel-belasteten Räumen (_____ Jahre)
- Intensiver Umgang mit Pflanzen, inkl. Topfpflanzen und Hydrokultur (_____ Jahre)
- Umgang mit Klimaanlage, Abluftanlagen oder Kühltechnik (_____ Jahre)
- Sonstige Arbeiten, bei denen intensiver Kontakt mit Schimmelpilzen bestanden haben könnte:



UPN: PW-				DATUM:	FRAGEBOGEN
UPN: LP-					

Wohnort

Welche Beschreibung trifft auf Ihren derzeitigen Wohnort am ehesten zu?

- Dorf (weniger als 2.000 Einwohner)
- Kleinstadt / Ortschaft mit weniger als 20.000 Einwohnern
- Mehr als 20.000 Einwohner (mittelgroße Stadt oder Großstadt)

Welche Merkmale treffen auf Ihren derzeitigen Wohnort zu?

(1 km Umkreis, nahe Umgebung)

- Landwirtschaftliche Betriebe oder landwirtschaftliche Nutzflächen im Umkreis von 1 km
- Weinbau im Umkreis von 1 km
- Holzverarbeitende Industrie im Umkreis von 1 km

Wie lange haben Sie (seit Geburt) in Wohnorten gelebt, auf die folgende Merkmale zutreffen?

- Dorf (weniger als 2.000 Einwohner) → Jahre
- Kleinstadt / Ortschaft mit weniger als 20.000 Einwohnern → Jahre
- Mehr als 20.000 Einwohner (mittelgroße Stadt oder Großstadt) → Jahre
- Landwirtschaftliche Betriebe inklusive Weinbau im Umkreis von 1 km → Jahre

Wohnumfeld

Welche Merkmale treffen auf Ihre Wohnung bzw. Ihr Anwesen zu?

- Eigener Nutzgarten
- Teichanlage, Wasserlauf oder ähnliche Anlagen im Gartenbereich
- Zimmerspringbrunnen, Aquarium
- Topfpflanzen inklusive Hydrokultur im Wohn- oder Schlafbereich
- Haltung von Haustieren (jeglicher Art)
- Intensive Nutzung von Kellerräumen z. B. als Lagerräume



UPN: PW-

--	--	--

DATUM:

FRAGEBOGEN

UPN: LP-

--	--	--

Bekannte Schimmelpilzbelastung

Ist in ihrer Wohnung / Ihrem Wohngebäude eine Schimmelbelastung bekannt?

Nein

Ja

Lokalisation: _____

Größe: _____ cm Durchmesser

Erreger, falls bekannt: _____

Seit wann bzw. wann saniert? _____

Nur für Wissenschaftler, die im Labor mit *Aspergillus* oder *Mucorales* arbeiten

Haben Sie in den letzten 4 Wochen im Labor mit vitalem *Aspergillus* bzw. mit vitalen *Mucorales* gearbeitet?

Nein

Ja

Wann zuletzt? _____

Welche(r) Erreger? _____

Art der Tätigkeiten? _____

Vielen Dank für Ihre Teilnahme!



Auswertung Fragebogen

UPN: PW-				DATUM:	<input type="checkbox"/> HIGH RISK
UPN: LP-					<input type="checkbox"/> LOW RISK

<p>Long Term Exposure (LTE)</p> <input type="checkbox"/> LTP (Prof) <input type="checkbox"/> LTR (Rural) <input type="checkbox"/> ---	<p>Current Professional Background (PRO)</p> <input type="checkbox"/> PRO Positive <input type="checkbox"/> LAB <input type="checkbox"/> ---	<p>Current Residential Surrounding (SUR)</p> <input type="checkbox"/> SUR Positive <input type="checkbox"/> ---	<p>Current Residential Factors (RES)</p> <input type="checkbox"/> MCO <input type="checkbox"/> ORF <input type="checkbox"/> ---
--	---	---	--

AfuH (CD154⁺/CD4⁺)	RarH (CD154⁺/CD4⁺)	RmpH (CD154⁺/CD4⁺)	CbeH (CD154⁺/CD4⁺)
PBMC _____ % VB8b _____ %	PBMC _____ % VB8b _____ %	PBMC _____ % VB8b _____ %	PBMC _____ % VB8b _____ %

<p>Ausgewertet von: (Name, Datum, Unterschrift)</p>	<p>Projektleiter: (Datum, Unterschrift, Stempel)</p>
--	---

6.4 Tabellenverzeichnis für Kapitel 1, 2 und 4

Tabelle 1: T Helferzellen. Die Tabelle beschreibt die wichtigsten Charakteristika der T-Helferzelltypen 1, 2 und 17. Adaptiert und erweitert aus [111].	20
Tabelle 2: Liste der geläufigsten kommerziell erhältlichen IFN-γ Release Assays (IGRAs). Abkürzungen: CMV= Cytomegalovirus, Tb = Tuberkulose.	29
Tabelle 3: Expositionsfaktor-Kategorien und Subkategorien. Expositionsfaktor-Kategorien und -Subkategorien, die eine Einschätzung über die Intensität der Schimmelpilzexposition eines Individuums ermöglichen. Probanden mit Langzeitexposition sowie einem aktuellen Expositionsfaktor (Exposition im beruflichen Umfeld, Exposition im Wohnumfeld und Exposition innerhalb des Wohnbereichs) oder mit drei aktuellen Expositionsfaktoren wurden als intensiv-, der Rest als geringexponierte Probanden klassifiziert [152, 175, 231].	53
Tabelle 4: Medien der Publikation Lauruschkat et al., Mycoses, 2018. Die Medien in dieser Tabelle wurden für die Publikation Lauruschkat et al., Mycoses, 2018 verwendet (übersetzt aus Lauruschkat et al., Mycoses, 2018) [232]. Abkürzungen: autol. Ser. = autologes Serum; FCS = fetales Kälberserum; RPMI = Roswell Park Memorial Institute Medium.	58
Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die PBMC-basierte Durchflusszytometrie. Antikörper für die Durchflusszytometrie der Veröffentlichung Lauruschkat et al., Mycoses, 2018, Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020 und Lauruschkat et al., J Fungi (Basel)., 2021b. Extrazelluläre Färbung; Intrazelluläre Färbung; Abkürzungen: APC = Allophycocyanin, BD = Becton Dickinson, BL = Biolegend, FITC = Fluorescein-5-isothiocyanat, MB = Miltenyi Biotec, PE = phycoerythrin, PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein, VB = Vollblut	61
Tabelle 6: Die verwendeten Stimuli und deren Konzentrationen sowie die verwendeten kostimulatorischen Faktoren und deren Konzentrationen für die PBMC-basierte Durchflusszytometrie. X zeigt an, dass die Komponente in der jeweiligen Kondition benutzt wurde. AfuLy = <i>A. fumigatus</i> Lysat (sowohl AfuM (Miltenyi) als auch AfuJ (HKI Jena) wurden in der gleichen Konzentration eingesetzt).....	62
Tabelle 7: Verwendete Stimuli und deren Konzentrationen sowie die verwendeten kostimulatorischen Faktoren und deren Konzentrationen für den ELISPOT. X zeigt an, dass die	

Komponente in der jeweiligen Kondition angewandt wurde. Abkürzungen: IL = Interleukin, IFN = Interferon, PHA = Phytohaemagglutinin, AfuLy = *A. fumigatus*-Lysat (sowohl AfuM (Miltenyi) als auch AfuJ (HKI Jena) wurden in der gleichen Konzentration eingesetzt), AfuPA = *A. fumigatus*-Proteinantigene, Uns. Kontrolle = Unstimulierte Kontrolle 64

Tabelle 8: Die für den ELISPOT verwendeten Antikörper, deren Verdünnung und der verwendete Verdünnungspuffer. Abkürzungen. DB = Verdünnungspuffer (*dilution buffer*), HRP = Meerrettichperoxidase, IL = Interleukin (Tabelle übernommen aus dem T-Track ELISPOT Handbuch des Herstellers Lophius Biosciences)..... 65

Tabelle 9: Ansätze für den VB-ELISA. X zeigt an, dass die Komponente in der jeweiligen Kondition benutzt wurde. Abkürzungen: AfuLy = *A. fumigatus*-Myzellysat, CD = *cluster of differentiation*, n/a = unzutreffend, PHA = Phytohemagglutinin, pp65 = Phosphoprotein 65, RPMI = Roswell Park Memorial Institute medium, VB = Vollblut (adaptiert und übersetzt aus Lauruschkat et. al., J Fungi (Basel), 2021a)..... 66

Tabelle 10: RPMI-Verdünnungsfaktor der gewonnenen Serum- und Zellüberstandsproben für konventionelle ELISAs und Luminex-Assays. Abkürzungen: AfuLy = *A. fumigatus*-Myzellysat, IL = Interleukin, IFN = Interferon, PHA = Phytohemagglutinin..... 68

Tabelle 11: Vorbereitung und Verdünnungen der Reagenzien für eine Platte ELISA. Abkürzungen: HRP = Meerrettichperoxidase (übersetzt und adaptiert aus [234]) 68

Tabelle 12: Antikörper für die VB-basierte Durchflusszytometrie. Antikörper für die Durchflusszytometrie der Veröffentlichung Lauruschkat et al., Open Forum Infect Dis., 2020 und Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021a). Direkt nach dem Auftauen der Stimulationsröhrchen, vor dem Einspritzen des Bluts in die Stimulationsröhrchen hinzugefügt; Viabilitätsfärbung (L/D) durchgeführt vor der extrazellulären Färbung in 1 mL HBSS für 30 min; Extrazelluläre Färbung; Intrazelluläre Färbung; Abkürzungen: Abkürzungen: APC = Allophycocyanin, BD = Becton Dickinson, BL = Biolegend, FITC = Fluorescein-5-isothiocyanat, I = Invitrogen, IR = Infrarot, MB = Miltenyi Biotec, PE = phycoerythrin, PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein, VB = Vollblut (übersetzt und adaptiert aus Lauruschkat et al., J Fungi (Basel), 2021a)..... 72

Tabelle 13: Kriterien für einen klinisch anwendbaren *A. fumigatus* T-Zell-Test und die Erfüllung dieser Kriterien in den verschiedenen Assays. Abkürzungen: CD = Cluster of

Differentiation, Durchflusszy. = Durchflusszytometrie, Std. = Stunden, PBMC = Mononukleäre
Zellen des peripheren Blutes, VB = Vollblut..... 193

6.5 Abbildungsverzeichnis für Kapitel 1, 2 und 4

Abbildung 1: *A. fumigatus*-assoziierte Pathologien. Die Inhalation von *A. fumigatus*-Konidien kann unterschiedliche Erkrankungen auslösen. Bei Menschen mit physiologischer Immunantwort löst der Pilz weder eine Infektion noch eine Hypersensibilitätskrankheit aus. Bei immunkompromittierten Patienten (ICH) kann der Pilz seinen Wirt infizieren, was zu einer invasiven Aspergillose führen kann. Eine milde Kompromittierung des Immunsystems (mild ICH) in chronischen respiratorischen Pathologien, kavitären Lungenerkrankungen oder Asthma können *A. fumigatus*-assoziierte Erkrankungen auslösen. Diese *A. fumigatus*-assoziierten Erkrankungen beinhalten das Aspergillom, die Chronische pulmonale Aspergillose (CPA), die Chronische nekrotisierende pulmonale Aspergillose (CNPA), die Allergische bronchopulmonale Aspergillose (ABPA) und das Schwere Asthma mit Pilzsensibilisierung (SAFS). Die Abbildung wurde aus dem Review-Artikel von van de Veerdonk und Kollegen übernommen [1]..... 6

Abbildung 2: Th-Antwort auf *A. fumigatus*. Die Erkennung von *A. fumigatus* durch Zellen des innate Immunsystems via PRRs leitet die Immunantwort ein. Naive Th-Zellen werden von DCs durch Antigenpräsentation auf MHC-II Molekülen (1.), kostimulatorische Faktoren (2.) und Zytokine (3.) aktiviert. Das Zytokinumfeld wird maßgeblich von EZs, DCs und AMs beeinflusst. Die vorhandenen Zytokine bestimmen, in welche Th-Subpopulationen die naiven Th-Zellen differenzieren. Die diversen Th-Subpopulationen exprimieren spezifische Transkriptionsfaktoren und lösen durch ihre Signalzytokine unterschiedliche Effektorfunktionen aus. EC/EZ = Epithelzelle; DC = Dendritische Zelle; AM = Alveolarmakrophage; Th = T-Helferzelle; IL = Interleukin; IFN = Interferon; TGF = Transforming growth factor; TNF = Tumor necrosis factor; AMP= Antimikrobielles Peptid; CTLA-4 = cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; PRRs = Pattern recognition receptors STAT = Signal Transducer and Activator of Transcription, ROR γ t = RAR-related orphan receptor gamma t; AHR = aryl hydrocarbon receptor; t-Bet = T-boxtranscription factor 21; GATA3 = Transkriptionsfaktor GATA3; PU.1 = Transkriptionsfaktor PU.1; FOXP3 = Forkhead box P3. Abbildung übernommen aus [112]. 23

Abbildung 3: Funktionsweise von QuantiFERON, T-Track, T-SPOT und experimentellen durchflusszytometrischen Assays. Für alle T-Zell-Tests wird dem Patienten peripheres Vollblut

(VB) abgenommen. Für den QuantiFERON-Test (ELISA) wird das Blut direkt in Teströhrchen entnommen, das die spezifischen Antigene enthält. Nach dem Vermengen von Blut und Antigenen wird die Suspension über Nacht inkubiert. In dieser Zeit sezernieren die aktivierten Immunzellen IFN- γ . Das Plasma wird abgenommen und in einem ELISA gemessen. Für T-Track und T-SPOT (beide ELISPOT) werden PBMCs aus dem VB isoliert und in Medium in eine ELISPOT-Platte gegeben. Dort werden die Zellen mit spezifischen Antigenen stimuliert und über Nacht inkubiert. Auch hier geben aktivierte Lymphozyten IFN- γ ab, das direkt auf der mit Fangantikörpern beschichteten Membran der Platte gebunden wird. Nach der Inkubationszeit wird die Zellsuspension entfernt und das sich auf der Membran befindliche IFN- γ gefärbt. So entstehen die für den ELISPOT charakteristischen Punkte an den Stellen, an denen eine Immunzelle IFN- γ sezerniert hat. Diese Platten werden abschließend in einem ELISPOT *Reader* ausgelesen [171]. Die durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Aktivierung kann sowohl aus VB als auch aus PBMCs durchgeführt werden. Die Zellen werden hierbei ebenfalls über Nacht mit spezifischen Antigenen stimuliert. Danach werden die Zellen mit Antikörpern, die mit Fluorochromen konjugiert sind, markiert. Diese Antikörper können gegen eine Vielzahl von Aktivierungs- und Populationsmarkern gerichtet sein. Die stimulierten und markierten Zellen werden anschließend in einem Durchflusszytometer gemessen [172-176]. Die Durchflusszytometrie und der ELISA können sowohl mit VB als aus PBMCs durchgeführt werden, während der ELISPOT nur mit PBMCs durchgeführt werden kann. 29

6.6 Abkürzungsverzeichnis

<i>A. clavatus</i>	<i>Aspergillus clavatus</i>
<i>A. flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>A. terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
AAS	Allergische <i>Aspergillus</i> Sinusitis
ABPA	Allergische Bronchopulmonale Aspergillose
AfuJ	<i>Aspergillus fumigatus</i> -Lysat von Dr. Olaf Kniemeyer, HKI Jena
AfuM	<i>Aspergillus fumigatus</i> -Lysat von der Firma Miltenyi Biotec
AHR	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>
AIA	<i>Aspergillus</i> induziertes Asthma
alloSZT	allogene Stammzelltransplantation
AM	Alveolarmakrophagen
AMP	Antimikrobielles Peptid
APCs	antigenpräsentierenden Zellen
BAL	<i>Bronchoalveolar Lavage</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CCL	CC-Motief-Ligand
CCPA	<i>Chronic Cavitary Pulmonary Aspergillosis</i>
CCR6	C-C-Chemokinrezeptor Typ 6
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>

CF	Zystische Fibrose
CFP-10	<i>culture filtrate protein-10</i>
CFPA	<i>Chronic Fibrotic Pulmonary Aspergillosis</i>
CGD	Chronischer Granulomatose
CMV	Cytomegalovirus
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
CPA	Chronische Pulmonale Aspergillose
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen</i>
CXCL	<i>C-X-C motif ligand</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DB	Verdünnungspuffer (<i>dilution buffer</i>)
DCs	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme Linked Immuno Spot Assay</i>
ESAT-6	<i>Tearly secreted antigen target-6</i>
EU	Endotoxineinheit
EZs	Epithelzellen
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FOXP3	Forkhead box P3
GAG	Galactosaminogalactan

GATA3	Transkriptionsfaktor GATA3
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
GM	Galactomannan
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor
HRP	Meerrettichperoxidase
IA	Invasive Aspergillose
IE-1	<i>immediate-early 1</i>
IFN(e)	Interferon(e)
Ig	Immunglobulin
IGRAs	IFN- γ <i>Release Assays</i>
IL	Interleukin
IM	Mucormykosen
IMI	Invasiven Schimmelpilzinfektionen
M1	Klassischen Makrophagenaktivierung
M2	Alternative Makrophagenaktivierung
MHCs	Haupthistokompatibilitätskomplexen
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
mo-DCs	Von Monozyten stammende dendritische Zellen
n/a	Nicht verfügbar
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
PBMCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
pDCs	Plasmacytoide dendritische Zellen

pETs	<i>Dendritic cell extracellular traps</i>
PHA	Phytohämagglutinin
pp	Phosphoprotein
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
PTX-3	Pentraxin-3
PU.1	Transkriptionsfaktor PU.1
QFN	QuantiFERON
<i>R. arrhizus</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
<i>R. oryzae</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
RORγt	<i>RAR-related orphan receptor gamma t</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT	Raumtemperatur
SAIA	<i>Subacute Invasive Aspergillosis</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>
SBO	Schädelbasis Osteomyelitis
SFCs	<i>Spot forming cells</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TB	Tuberkulose
T-bet	<i>T-boxtranscription factor 21</i>
TCRs	T-Zell-Rezeptoren
Tfh	Follikuläre T-Helferzelle
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor

Th	T-Helfer(zellen)
TNF	Tumornekrosefaktor
TST	Tuberkulin-Hauttest
Uns. Kontrolle	Unstimulierte Kontrolle
VB	Vollblut

6.7 Publikationsliste

Die Daten meiner Dissertation wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

- Susceptibility of *A. fumigatus*-specific T-cell assays to pre-analytic blood storage and PBMC cryopreservation greatly depends on readout platform and analytes.
Lauruschkat CD*, Wurster S*, Page L, Lazariotou M, Dragan M, Weis P, Ullmann AJ, Einsele H., Löffler J. *Mycoses*. 2018 Aug;61(8):549-560. doi: 10.1111/myc.12780. Epub 2018 Jun 11.
- T-Cell Immune Surveillance in Allogenic Stem Cell Transplant Recipients: Are Whole Blood-Based Assays Ready to Challenge ELISPOT?.
Lauruschkat CD*, Page L*, Etter S, Weis P, Gamon F, Kraus S, Einsele H., Wurster S#, Loeffler J#. *Open Forum Infect Dis*. 2020 Nov 8;8(1):ofaa547. doi: 10.1093/ofid/ofaa547. eCollection 2021 Jan.
- Development of a simple and robust whole blood assay with dual co-stimulation to quantify the release of T-cellular signature cytokines in response to *Aspergillus* antigens.
Lauruschkat CD, Page L, White PL, Etter S, Davies HE, Duckers J, Ebel F, Schnack E, Backx M, Dragan M, Schlegel N, Kniemeyer O, Brakhage AA, Einsele H., Loeffler J #, Wurster S#. *J Fungi (Basel)*. 2021 Jun 8;7(6):462. doi: 10.3390/jof7060462. (a)
- Chronic occupational mold exposure drives expansion of *Aspergillus*-reactive type 1 and type 2 T-helper cell responses.
Lauruschkat CD, Etter S, Schnack E, Ebel F, Schäuble S, Page L, Rümens D, Dragan M, Schlegel N, Panagiotou G, Kniemeyer O, Brakhage AA, Einsele H., Wurster S#, Loeffler J #. *J Fungi (Basel)*. 2021 Aug 27;7(9):698. doi: 10.3390/jof7090698. (b) (Die experimentellen ELISPOT-Daten von Abbildung 4, 5 sowie die ELISPOT-Daten, die einen Teil von Abbildung 6 ausmachen, und die serologischen Daten, die im Artikel mit *data not shown* gezeigt wurden, wurden von Frau Sonja Etter generiert und werden als Teil Ihrer Dissertation in veränderter Form eingereicht.)

* geteilte Erstautorenschaft, # geteilte Letztautorenschaft

Die Daten meiner Dissertation wurden in den folgenden Kongressbeiträgen veröffentlicht:

- Optimal PBMC cryopreservation protocols for *A. fumigatus* specific T-cell quantification depend on downstream assay and analytes.
Lauruschkat CD, Page L, Lazariotou M, Dragan M, Ullmann AJ, Einsele H., Löffler J, Wurster S. ECCMID 2018. Conference.
- T-Zell-Assays als potenzielle surrogative Marker für die Aspergillose.
Lauruschkat CD. PEG Frühjahrssymposium. Bonn. 2019. Oral Presentation.
Deutschsprachig, daher nicht promotionsrelevant.
- Discrimination of *A. fumigatus* exposure levels by ELISPOT and western blot.
Lauruschkat CD, Etter S, Schnack E, Page L, Wurster S, Einsele H., Ebel F, Loeffler J. EUREKA. Würzburg. 2019. Conference.
- Establishment of a whole blood ELISA to quantify T-cellular cytokine release in response to *Aspergillus fumigatus* antigens.
Lauruschkat CD, Page L, Etter S, Schnack E, Ebel F, Loeffler J *, Wurster S*.AAAM. Lugano. 2020. Conference.

Während der Dissertationszeit habe ich den folgenden Reviewartikel veröffentlicht:

Immunomodulation as a Therapy for Aspergillus Infection: Current Status and Future Perspectives.

Lauruschkat CD, Einsele H., Loeffler J. J Fungi (Basel). 2018 Dec 14;4(4):137. doi: 10.3390/jof4040137. Review.

Während der Dissertationszeit war ich in weitere Projekte außerhalb meiner Dissertation eingebunden, die in den folgenden Artikeln resultierten:

- Development and evaluation of a whole blood-based approach for flow cytometric quantification of CD154+ mould-reactive T cells.
Weis P, Helm J, Page L, **Lauruschkat CD**, Lazariotou M, Einsele H., Loeffler J, Ullmann AJ, Wurster S. Med Mycol. 2020 Feb 1;58(2):187-196. doi: 10.1093/mmy/myz038.

- Impact of immunosuppressive and antifungal drugs on PBMC- and whole blood-based flow cytometric CD154+ *Aspergillus fumigatus* specific T-cell quantification.

Page L, **Lauruschkat CD**, Helm J, Weis P, Lazariotou M, Einsele H., Ullmann AJ, Loeffler J, Wurster S. *Med Microbiol Immunol.* 2020 Oct;209(5):579-592. doi: 10.1007/s00430-020-00665-3. Epub 2020 Mar 31.

6.8 “Dissertation Based on Several Published Manuscripts”

Statement of individual author contributions and of legal second publication rights

Publication (complete reference):					
Susceptibility of <i>A. fumigatus</i> -specific T-cell assays to pre-analytic blood storage and PBMC cryopreservation greatly depends on readout platform and analytes. Lauruschkat CD* , Wurster S*, Page L, Lazariotou M, Dragan M, Weis P, Ullmann AJ, Einsele H., Löffler J. <i>Mycoses</i> . 2018 Aug;61(8):549-560. doi: 10.1111/myc.12780. Epub 2018 Jun 11.					
* shared first authorship					
Participated in	Author Initials, Responsibility decreasing from left to right				
Study Design	WS, LCD	LJ	EH, UAJ		
Methods Development	WS, LCD	WP, PL	LJ		
Data Collection	LCD, WS	PL	LM	DM	
Data Analysis and Interpretation	WS, LCD	PL, LJ, WP			
Manuscript Writing					
Writing of Introduction	LCD	WS	LJ	EH, UAJ	
Writing of Materials & Methods	LCD	WS	LJ	EH, UAJ	
Writing of Discussion	WS	LCD	LJ	EH, UAJ	
Writing of First Draft	WS, LCD		LJ	EH, UAJ	

Explanations (if applicable):

Publication (complete reference):					
T-Cell Immune Surveillance in Allogeneic Stem Cell Transplant Recipients: Are Whole Blood-Based Assays Ready to Challenge ELISPOT?. Lauruschkat CD* , Page L*, Etter S, Weis P, Gamon F, Kraus S, Einsele H., Wurster S#, Loeffler J#. <i>Open Forum Infect Dis</i> . 2020 Nov 8;8(1):ofaa547. doi: 10.1093/ofid/ofaa547. eCollection 2021 Jan.					
* shared first authorship, # shared last authorship					

Participated in	Author Initials, Responsibility decreasing from left to right				
Study Design	LCD, WS	LJ	KS, EH		
Methods Development	LCD	WS, PL			
Data Collection	LCD, PL	ES			
Data Analysis and Interpretation	WS, LCD	PL, LJ	GF		
Manuscript Writing					
Writing of Introduction	LCD	WS	LJ	EH	
Writing of Materials & Methods	LCD	WS	LJ	EH	
Writing of Discussion	WS, LCD		LJ	EH	
Writing of First Draft	LCD	WS	LJ, KS	EH	

Explanations (if applicable):

<p>Publication (complete reference):</p> <p>Development of a simple and robust whole blood assay with dual co-stimulation to quantify the release of T-cellular signature cytokines in response to <i>Aspergillus</i> antigens. Lauruschkat CD, Page L, White PL, Etter S, Davies HE, Duckers J, Ebel F, Schnack E, Backx M, Dragan M, Schlegel N, Kniemeyer O, Brakhage AA, Einsele H., Loeffler J #, Wurster S#. <i>J Fungi</i> (Basel). 2021 Jun 8;7(6):462. doi: 10.3390/jof7060462.</p> <p># shared last authorship</p>
--

Participated in	Author Initials, Responsibility decreasing from left to right				
Study Design	LCD, WS	LJ, WPL, PL	DHE, EF, EH	SN, BAA	
Methods Development	LCD	WS	PL		
Data Collection	LCD	PL, DHE	ES, SE, EF	DJ, BM, KO	DM
Data Analysis and Interpretation	WS, LCD	LJ	WPL, DHE		
Manuscript Writing					
Writing of Introduction	LCD	WS	LJ	EH	
Writing of Materials & Methods	LCD	WS	LJ	EH	
Writing of Discussion	LCD	WS	LJ	EH	
Writing of First Draft	LCD	WS	WPL, DHE	LJ	EH

Explanations (if applicable):

<p>Publication (complete reference):</p> <p>Chronic occupational mold exposure drives expansion of <i>Aspergillus</i>-reactive type 1 and type 2 T-helper cell responses.</p>
--

Lauruschkat CD, Etter S, Schnack E, Ebel F, Schäuble S, Page L, Rümens D, Dragan M, Schlegel N, Panagiotou G, Kniemeyer O, Brakhage AA, Einsele H., Wurster S[#], Loeffler J [#]. *J Fungi* (Basel). 2021 Aug 27;7(9):698. doi: 10.3390/jof7090698.

[#] shared last authorship

The experimental ELISPOT data in figure 4, 5 and the ELISPOT data, which are included in figure 6 as well as the serological data marked as data not shown in the paper were generated by Sonja Etter and will be published in her dissertation in altered form.

Participated in	Author Initials , Responsibility decreasing from left to right				
Study Design	LCD, WS	LJ, PL	EF, EH	SN, BAA, PG	
Methods Development	LCD, WS, PL	LJ, SE, EF			
Data Collection	LCD	ES, PL, SE	KO	RD, DM	
Data Analysis and Interpretation	WS, LCD	LJ, SS	EF		
Manuscript Writing					
Writing of Introduction	LCD	WS	LJ	EH	
Writing of Materials & Methods	LCD	WS	SS, FE, KO	EH	
Writing of Discussion	LCD	WS	FE, LJ	EH	
Writing of First Draft	LCD	WS	LJ	EH	

Explanations (if applicable):

The doctoral researcher confirms that she/he has obtained permission from both the publishers and the co-authors for legal second publication.

The doctoral researcher and the primary supervisor confirm the correctness of the above mentioned assessment.

Doctoral Researcher's Name Date Place Signature

Primary Supervisor's Name Date Place Signature

6.9 “Dissertation Based on Several Published Manuscripts”

Statement of individual author contributions to figures/tables/chapters included in the manuscripts

Publication (complete reference):					
Susceptibility of <i>A. fumigatus</i> -specific T-cell assays to pre-analytic blood storage and PBMC cryopreservation greatly depends on readout platform and analytes. Lauruschkat CD* , Wurster S*, Page L, Lazariotou M, Dragan M, Weis P, Ullmann AJ, Einsele H., Löffler J. <i>Mycoses</i> . 2018 Aug;61(8):549-560. doi: 10.1111/myc.12780. Epub 2018 Jun 11.					
* shared first authorship					
Figure	Author Initials, Responsibility decreasing from left to right				
1	LCD	WS	PL	LM	JL, EH, UAJ
2	WS	LCD	PL	LM, WP	JL, EH, UAJ
3	LCD	WS	PL	LM	JL, EH, UAJ
4	WS	LCD	PL	LM, WP	JL, EH, UAJ
5	LCD	WS	PL	LM	JL, EH, UAJ
6	WS	LCD	PL	LM, DM	JL, EH, UAJ
Sup. Fig. 1	LCD	WS	PL	LM	JL, EH, UAJ
Sup. Fig. 2	LCD	WS	PL	LM	JL, EH, UAJ
Sup. Fig. 3	WS	LCD	PL	LM, WP	JL, EH, UAJ
Sup. Fig. 4	WS	LCD	PL	LM, WP	JL, EH, UAJ
Sup. Fig. 6	LCD	WS	PL	LM	JL, EH, UAJ
Sup. Fig. 7	LCD	WS	PL	LM	JL, EH, UAJ
Sup. Fig. 8	LCD	WS	PL	LM	JL, EH, UAJ
Sup. Fig. 9	WS	LCD	PL	LM	JL, EH, UAJ
Sup. Ta. 1	LCD	WS	PL	JL, EH, UAJ	
Sup. Ta. 2a	LCD	WS	PL	JL, EH, UAJ	
Sup. Ta. 2b	PL	LCD	WS	JL, EH, UAJ	
Sup. Ta. 2c	LCD	PL	WS	JL, EH, UAJ	
Sup. Ta. 3	LCD	WS	PL	JL, EH, UAJ	
Sup. Ta. 4	LCD	WS	PL	JL, EH, UAJ	
Sup. Ta. 5	LCD	WS	PL	JL, EH, UAJ	

Explanations (if applicable):

Publication (complete reference):

T-Cell Immune Surveillance in Allogenic Stem Cell Transplant Recipients: Are Whole Blood-Based Assays Ready to Challenge ELISPOT?. **Lauruschkat CD***, Page L*, Etter S, Weis P, Gamon F, Kraus S, Einsele H., Wurster S#, Loeffler J#. Open Forum Infect Dis. 2020 Nov 8;8(1):ofaa547. doi: 10.1093/ofid/ofaa547. eCollection 2021 Jan.

* shared first authorship, # shared last authorship

Figure	Author Initials, Responsibility decreasing from left to right				
1	LCD	PL	WS, ES	WP	JL, EH, KS
2	LCD	PL	WS, ES	GF	JL, EH, KS
Sup. M. 1	LCD	WS	PL		JL, EH, KS
Sup. M. 2	WS	LCD	GF, KS	PL	JL, EH
Sup. M. 3	LCD	WS	JL, EH, KS		
Sup. M. 4	LCD	WS	JL, EH, KS		
Sup. M. 5	LCD	WS	JL, EH, KS		
Sup. M. 6	LCD	PL	WS	JL, EH, KS	
Sup. M. 7	LCD	PL	WS	JL, EH, KS	
Sup. M. 8	LCD	WS	PL	JL, EH, KS	
Sup. M. 9	LCD	PL	WS	JL, EH, KS	
Sup. M. 10	LCD	PL	WS	JL, EH, KS	
Sup. M. 11	LCD	PL	ES	WS	JL, EH, KS
Sup. M. 12	LCD	PL	WS	ES	JL, EH, KS

Explanations (if applicable):

Publication (complete reference):

Development of a simple and robust whole blood assay with dual co-stimulation to quantify the release of T-cellular signature cytokines in response to *Aspergillus* antigens. **Lauruschkat CD**, Page L, White PL, Etter S, Davies HE, Duckers J, Ebel F, Schnack E, Backx M, Dragan M, Schlegel N, Kniemeyer O, Brakhage AA, Einsele H., Loeffler J #, Wurster S#. Journal of Fungi. 2021. J Fungi (Basel). 2021 Jun 8;7(6):462. doi: 10.3390/jof7060462.

shared last authorship

Figure	Author Initials, Responsibility decreasing from left to right				
Table 1	LCD	WS	LJ	EH	
1	LCD	PL	WS	KO	LJ, EH, BAA
2	LCD	WS	LJ	KO	LJ, EH, BAA
3	LCD	PL	ES, WS	SE, KO, EF	LJ, EH, BAA
4	LCD	PL	ES, WS	SE, KO, EF	LJ, EH, BAA

5	LCD	WPL, DHE, LJ	WS	DJ, BM, DM	KO, EH, SN
Tab. S1	LCD	WS	LJ	EH	
Tab. S2	LCD	WPL, DHE, LJ	WS	DJ, BM, DM	KO, EH, SN
Tab. S3	LCD	WPL, DHE, LJ	WS	DJ, BM, DM	KO, EH, SN

Explanations (if applicable):

Publication (complete reference):					
Chronic occupational mold exposure drives expansion of <i>Aspergillus</i> -reactive type 1 and type 2 T-helper cell responses.					
Lauruschkat CD , Etter S, Schnack E, Ebel F, Schäuble S, Page L, Rümens D, Dragan M, Schlegel N, Panagiotou G, Kniemeyer O, Brakhage AA, Einsele H., Wurster S [#] , Loeffler J [#] . J Fungi (Basel). 2021 Aug 27;7(9):698. doi: 10.3390/jof7090698.					
# shared last authorship					
The experimental ELISPOT data in figure 4, 5 and the ELISPOT data, which are included in figure 6 as well as the serological data marked as data not shown in the paper were generated by Sonja Etter and will be published in her dissertation in altered form.					
Figure	Author Initials, Responsibility decreasing from left to right				
1	LCD	ES	PL, WS	LJ, EH	KO, BAA, RD
2	LCD	PL, SE, EF	WS	ES, DM, SN	JL, KO, EH
3	LCD	PL, SS	ES, WS	JL, KO, EH	RD, BAA
4	ES	LCD, SE, EF	WS, PL	JL, KO, EH	RD, BAA
5	ES	LCD, WS, SE	EF, PL	JL, KO, EH	RD, BAA
6	LCD	ES, PL, SE, EF	WS	DM, SN	JL, KO, EH
S1	LCD	WS, PL, ES	JL, KO, EH	RD, BAA	
S2	LCD	ES	PL, WS	LJ, EH	KO, BAA, RD
S3	LCD	PL, SE, EF	WS	ES, DM, SN	JL, KO, EH
S4	LCD	PL, SE, EF	WS	ES, DM, SN	JL, KO, EH
S5	LCD	PL, SE, EF	WS	ES, DM, SN	JL, KO, EH
S6	LCD	PL, SS	ES, WS	JL, KO, EH	RD, BAA
Tab. S1	SE	EF			
Tab. S2	LCD	WS			

Explanations (if applicable):

The experimental ELISPOT data in figure 4, 5 and the ELISPOT data, which are included in figure 6 as well as the serological data marked as data not shown in the paper were generated by Sonja Etter and will be published in her dissertation in altered form.

I also confirm my primary supervisor's acceptance.

Doctoral Researcher's Name	Date	Place	Signature
----------------------------	------	-------	-----------

6.10 Plagiarism check/ Plagiatsprüfung

A plagiarism check was conducted by iThenticate (<https://www.ithenticate.com/>) with the license of the University of Wuerzburg. No violations of the examination regulations were detected.

Doctoral Researcher's Name	Date	Place	Signature
----------------------------	------	-------	-----------

Primary Supervisor's Name	Date	Place	Signature
---------------------------	------	-------	-----------

Eine Plagiatprüfung wurde mittels iThenticate (<https://www.ithenticate.com/>) mit der Lizenz der Universität Würzburg durchgeführt. Es wurden keine Verstöße gegen die Prüfungsvorschriften festgestellt.

Doktorand Name	Datum	Ort	Unterschrift
----------------	-------	-----	--------------

Erstbetreuer Name	Datum	Ort	Unterschrift
-------------------	-------	-----	--------------

Affidavit/Eidesstattliche Erklärung

I hereby confirm that my thesis entitled **Development of functional immunoassays to study human host responses to the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*** is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation **Entwicklung funktioneller Immunassays zur Detektion der humanen Immunantwort auf das opportunistische Pathogen *Aspergillus fumigatus*** eigenständig, d.Std. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift