



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2007 052 517 A1** 2009.04.30

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2007 052 517.8**

(22) Anmeldetag: **29.10.2007**

(43) Offenlegungstag: **30.04.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 21/64** (2006.01)

(71) Anmelder:

**Autoimmun Diagnostika GmbH, 72479 Straßberg,  
DE**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte Ruff, Wilhelm, Beier, Dauster &  
Partner, 70174 Stuttgart**

(72) Erfinder:

**Schöllhorn, Volkmar, 72458 Albstadt, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu  
ziehende Druckschriften:

**DE10 2005 048577 A1**

**DE 203 20 889 U1**

**US 66 42 062 B2**

**US2004/00 38 241 A1**

**US 59 39 281 A**

**EP 09 57 359 A2**

**WO 05/0 45 396 A2**

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **ELISPOT-Verfahren mit zwei Filtersystemen**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein ELIS-POT-Verfahren, insbesondere zur In-vitro-Diagnose und/oder In-vitro-Therapieüberwachung von Infektionen und/oder Infektionserkrankungen, wobei eukaryotische Zellen mit einem Antigen inkubiert werden und die Anzahl an immunkompetenten Zellen gemessen wird, die zumindest zwei verschiedene Zytokine als Reaktion auf das Antigen ausscheiden, wobei zur Messung der immunkompetenten Zellen diese zumindest mit Hilfe von zwei verschiedenen Farbstoffen und zumindest zwei verschiedenen Filtersätzen visualisiert werden, wobei die Filtersätze Schmalbandfilter aufweisen.

## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein ELISPOT-Verfahren zur in vitro-Diagnose und/oder in vitro-Therapieüberwachung von Infektionen und/oder Infektionserkrankungen sowie ein diesbezügliches Kit.

**[0002]** Der sogenannte „Enzyme-linked immunospot assay“ (ELISPOT) wird unter anderem zur Messung der antigenspezifischen Aktivität von Blutzellen verwendet. Der Test wird üblicherweise in Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten durchgeführt, wobei jede Kavität am Boden eine Membran trägt, auf der sich bei positivem Ausfall des Tests eine lokale Farbreaktion um einzelne aktivierte Zellen ausbildet. Die Auswertung geschieht durch einfaches Auszählen der Punkte oder unter Einsatz von digitalen Bildverarbeitungssystemen, wobei neben der Anzahl der Punkte auch die Größe und Intensität der Punkte quantifiziert werden kann. Die Farbreaktion beruht auf dem Nachweis von lokal gebildeten Botenstoffen, die über Membran gekoppelte primäre Antikörper gebunden werden. Diese lokal gebundenen Botenstoffe werden dann durch die Bindung eines zweiten, gegen den gleichen Botenstoff gerichteten Antikörpers, der direkt oder indirekt mit einer Farbreaktion gekoppelt wird, visualisiert.

**[0003]** Bisher wurde bei der Aktivitätsmessung von Zellen ausschließlich die Anzahl der reaktiven Zellen gemessen, um daraus Rückschlüsse auf ihre Aktivität ziehen zu können. Diesbezüglich wurde jedoch erkannt, dass es nicht so sehr, bzw. nicht nur auf die Anzahl der reagierenden Zellen, sondern vor allem auch auf die Qualität der Reaktion der einzelnen Zellen ankommt. So können einzelne Zellen sehr unterschiedlich auf das gleiche Antigen reagieren, was sich in der Quantität der abgegebenen Botenstoffe und damit in der Quantität der im vorherigen Abschnitt erwähnten Farbreaktion jeder einzelnen Zelle manifestiert. In der EP 0 957 359 A2 wird daher ein ELISPOT-Verfahren beschrieben, bei welchem nicht nur die Anzahl der reaktiven Zellen ermittelt wird, sondern auch die Intensität der Gesamtreaktion. Dies erlaubt wesentlich weitergehende Schlüsse auf die Aktivität der Zellen.

**[0004]** Grundsätzlich erlaubt das in der EP 0 957 359 A2 beschriebene Verfahren auch die Messung von Zellen, die in Gegenwart eines Antigens unterschiedliche Botenstoffe ausscheiden. Hierfür wird gegebenenfalls eine entsprechende Anzahl unterschiedlicher Chemolumineszenz- oder Fluoreszenzfarbstoffe verwendet.

**[0005]** Ein grundsätzliches Problem des ELISPOT-Verfahrens besteht jedoch hinsichtlich der gezielten Erfassung von Zellen, die in Gegenwart eines Antigens zwei oder mehrere verschiedene Botenstoff-

fe ausscheiden. Das Problem besteht insbesondere darin, diese Zellen von anderen Zellen, die lediglich einen Botenstoff ausscheiden, getrennt zu erfassen.

**[0006]** Wie bereits einleitend erwähnt, beruht die Messung von Zellen im Rahmen des ELISPOT-Verfahrens in der Regel auf Farbreaktionen, die auf Chemolumineszenz- oder Fluoreszenz-Eigenschaften entsprechender Farbstoffe zurückgehen. Die zur Chemolumineszenz- bzw. Fluoreszenz-Messung üblicherweise verwendeten Filtersysteme beruhen gewöhnlich auf einem einzigen Filtersatz, der bezüglich der Anregung und der Emission eines Farbstoffes nur für Licht eines bestimmten Wellenlängenbereiches durchlässig ist. Zwar kommen mittlerweile auch sogenannte Dualfilter zum Einsatz. Nachteilig hierbei ist jedoch, dass diese Filter für einen verhältnismäßig breiten Spektralbereich durchlässig sind. Da Farbstoffe allgemein auch außerhalb ihres „idealen“ Spektralbereiches Licht absorbieren und emittieren können, würde der Einsatz von Dualfiltern bei der Messung von Zellen, die zwei oder mehrere verschiedene Botenstoffe ausscheiden, zu einer erheblichen Einschränkung der Messgenauigkeit führen. Verstärkt wird dieses Problem dadurch, dass die Botenstoffe gewöhnlich in unterschiedlichen Mengen von besagten Zellen ausgeschieden werden.

**[0007]** Die Erfindung stellt sich daher die Aufgabe, ein ELISPOT-Verfahren bereitzustellen, welches aus dem Stand der Technik bekannte Nachteile vermeidet und insbesondere für eine sensitive Messung von Zellen geeignet ist, welche zwei oder mehrere verschiedene Botenstoffe ausscheiden.

**[0008]** Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein ELISPOT-Verfahren, insbesondere zur in vitro-Diagnose und/oder in vitro-Therapieüberwachung von Infektionen und/oder Infektionserkrankungen, wobei eukaryotische Zellen mit einem Antigen inkubiert werden und die Anzahl an immunkompetenten Zellen gemessen wird, die zumindest zwei verschiedene Zytokine als Reaktion auf das Antigen ausscheiden, wobei zur Messung der immunkompetenten Zellen diese zumindest mit Hilfe von zwei verschiedenen Farbstoffen und zumindest zwei verschiedenen Filtersätzen visualisiert werden, wobei die Filtersätze Schmalbandfilter aufweisen.

**[0009]** Durch die Erfindung wird ein ELISPOT-Verfahren bereitgestellt, welches eine selektive Erfassung von Immunzellen, die zwei oder mehrere verschiedene Zytokine ausscheiden, gegenüber anderen Immunzellen, die lediglich einen Zytokintyp ausscheiden, erlaubt. Die selektive Messung besagter Immunzellen beruht erfindungsgemäß auf der Verwendung von verschiedenen Filtersätzen mit Schmalbandfiltern, deren begrenzte Transmission (Durchlässigkeit) für Anregungs- und Emissionslicht von Farbstoffen eine selektive Erfassung von Farb-

stofflumineszenzen, vorzugsweise Farbstofffluoreszenzen, ermöglicht (Schmalbandfilter sind Bandpaßfilter, die nur für einen engen Spektralbereich durchlässig sind). Mit besonderem Vorteil kann dadurch vermieden werden, dass Lumineszenzen verschiedener Farbstoffe interferieren und insbesondere schwache Lumineszenzen von starken Lumineszenzen überlagert werden. Dadurch wird eine im Vergleich zu den aus dem Stand der Technik bekannten ELISPOT-Verfahren deutlich erhöhte Sensitivität für Immunzellen erreicht, die in Gegenwart eines Antigens zwei oder mehrere verschiedene Zytokine ausschütten. Die im Rahmen der Erfindung zum Einsatz kommenden Schmalbandfilter sind an sich bekannt. Sie wurden bisher allerdings lediglich auf dem Gebiet der Spurenanalytik eingesetzt.

**[0010]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden pro Filtersatz Schmalbandfilter verwendet, die jeweils komplementär zu den spektralen Eigenschaften eines der Farbstoffe sind. Dadurch können in vorteilhafter Weise die bereits erwähnten Lumineszenzüberlagerungen vermieden werden.

**[0011]** Erfindungsgemäß kann es grundsätzlich vorgesehen sein, dass die Filtersätze neben Schmalbandfiltern auch Breitbandfilter aufweisen. Bevorzugt werden jedoch zur Visualisierung der immunkompetenten Zellen Filtersätze verwendet, die ausschließlich Schmalbandfilter aufweisen. In einer weiteren Ausführungsform wird pro Filtersatz mit zwei Schmalbandfiltern gearbeitet. Erfindungsgemäß ist es insbesondere vorgesehen, dass jeder Filtersatz aus zwei Schmalbandfiltern besteht.

**[0012]** Pro Filtersatz wird mit verschiedenen Schmalbandfiltertypen gearbeitet. Vorzugsweise wird pro Filtersatz ein Schmalband-Anregungsfilter und ein Schmalband-Sperrfilter verwendet. Der Schmalband-Anregungsfilter besitzt zweckmäßigerweise eine möglichst hohe Durchlässigkeit (Transmission) für Licht, welches zur Lumineszenzanregung der Farbstoffe vorgesehen ist. Im Falle von Fluoreszenz wird typischerweise längerwelliges (energiearmes) Licht von diesem Schmalband-Filtertyp zurückgehalten und steht daher für eine Anregung der Farbstoffe nicht zur Verfügung. Der Schmalband-Sperrfilter weist normalerweise eine hohe Durchlässigkeit für das von den Farbstoffen emittierte Licht auf. Im Falle der Fluoreszenz wird daher das kurzwellige (energiereiche) Anregungslicht möglichst vollständig eliminiert.

**[0013]** In den Filtersätzen werden gemäß einer weitergehenden Ausführungsform verschiedene Schmalband-Anregungsfilter eingesetzt, insbesondere solche Anregungsfilter, welche für verschiedene Wellenlängenbereiche des Lichts durchlässig (transmissiv) sind. Besonders bevorzugt werden in den Filtersätzen Schmalband-Anregungsfilter verwendet,

die für im Wesentlichen nicht überlappende Wellenlängenbereiche des Lichts durchlässig sind, insbesondere des kurzwelligen Lichts.

**[0014]** In einer weiteren Ausführungsform werden in den Filtersätzen verschiedene Schmalband-Sperrfilter verwendet, insbesondere solche Sperrfilter, welche für verschiedene Wellenlängenbereiche des Lichts durchlässig sind. Vorzugsweise sind die in den Filtersätzen verwendbaren Schmalband-Sperrfilter für im Wesentlichen nicht überlappende Wellenlängenbereiche des Lichts, insbesondere des längerwelligen Lichts, durchlässig.

**[0015]** Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens können grundsätzlich alle Farbstoffe verwendet werden, welche hierfür geeignete Lumineszenzeigenschaften aufweisen. Gewöhnlich werden Chemolumineszenz- oder Fluoreszenz-Farbstoffe verwendet. Bevorzugt kommen Fluoreszenz-Farbstoffe zum Einsatz. Entsprechend wird im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens normalerweise die Chemolumineszenz oder Fluoreszenz, vorzugsweise Fluoreszenz, der Farbstoffe gemessen.

**[0016]** Als mögliche Fluoreszenz-Farbstoffe können im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens insbesondere Cumarinderivate, Rhodaminderivate, Auraminderivate, Cyanine, Phycoerythrin, Allophycocyanin und Fluoresceinisothiocyanat verwendet werden. Cyanine, insbesondere Cyanin 3 (Cy3) und Fluoresceinisothiocyanat sind besonders bevorzugt.

**[0017]** Bevorzugt werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens Fluoreszenz-Filtersätze verwendet. Bei den verwendbaren Fluoreszenzfiltern kann es sich um Kombinationen von Farbgläsern (Absorptionsfiltern) und Interferenzfiltern handeln. Bevorzugt kommen Interferenzfilter zum Einsatz.

**[0018]** Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden daher zur Visualisierung der immunkompetenten Zellen zumindest ein Filtersatz mit Schmalbandfiltern für Fluoresceinisothiocyanat und zumindest ein Filtersatz mit Schmalbandfilter für Cyanin 3 verwendet. Der Schmalbandfilter, der für die Anregung von Fluoresceinisothiocyanat vorgesehen ist, weist vorzugsweise eine Durchlässigkeit für Licht im Wellenlängenbereich zwischen 460 und 500 nm auf. Entsprechend weist der Schmalbandfilter, der für die Emission von Fluoresceinisothiocyanat vorgesehen ist, bevorzugt eine Durchlässigkeit für Licht im Wellenlängenbereich zwischen 512 und 542 nm auf. Der bevorzugte Lichtdurchlässigkeitsbereich für einen Schmalbandfilter, der für die Anregung von Cyanin 3 vorgesehen ist, liegt im Wellenlängenbereich zwischen 541 und 551 nm. Der Lichtdurchlässigkeitsbereich für einen Schmalbandfilter, der für die Emission von Cyanin 3 vorgesehen ist, liegt vorzugsweise in einem Wellenlängenbereich zwischen 572 und 647

nm.

**[0019]** Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens werden gewöhnlich Filtersätze verwendet, die neben den Schmalbandfiltern einen sogenannten Strahlteiler aufweisen. Der Strahlteiler sorgt mit besonderem Vorteil für eine optimale Lichtführung. So wird im Falle von Fluoreszenz kurzwelliges Licht reflektiert, wohingegen langwelliges Licht den Strahlteiler nahezu ungehindert passieren kann. Dadurch wird einerseits das Anregungslicht in Richtung der Farbstoffe „umgelenkt“. Andererseits wirkt der Strahlteiler in besonders vorteilhafter Weise als zusätzliche Sperre für kurzwelliges, bei der Visualisierung der immunkompetenten Zellen störendes Licht. Erfindungsgemäß ist es insbesondere vorgesehen, dass die im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendbaren Schmalbandfilter, insbesondere ein Schmalband-Anregungsfilter und ein Schmalband-Sperfilter, zusammen mit einem Strahlteiler eine funktionelle Einheit bilden und vorzugsweise mechanisch in einem einzigen Element, dem sogenannten Filterblock, integriert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren kann daher insbesondere mit zumindest zwei Filterblöcken der vorstehend beschriebenen Art durchgeführt werden.

**[0020]** Weiterhin können die Filtersätze auf einem vorzugsweise drehbaren Filterrad angeordnet sein. Die Drehung des Filterrads kann beispielsweise mit einem Schrittmotor erreicht werden.

**[0021]** Wie bereits erwähnt, besteht ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens darin, dass je nach Schmalbandfilter spezifisch die Lumineszenz eines Farbstoffes mit entsprechenden spektralen Eigenschaften, insbesondere Absorptions- und Emissionsmaxima, erfasst werden kann, ohne dass es zu einer störenden Überlagerung mit einer Lumineszenz eines anderen Farbstoffes kommt. Entsprechend ist es bevorzugt, dass zur Visualisierung der immunkompetenten Zellen die Lumineszenzen der Farbstoffe getrennt voneinander gemessen werden. Dies bedeutet, dass pro Testansatz, insbesondere pro Kavität oder Loch bzw. Vertiefung einer Mikrotiterplatte, im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Visualisierung der immunkompetenten Zellen zumindest zwei zweidimensionale Bilder erzeugt werden. Die zweidimensionalen Bilder werden gewöhnlich dadurch erzeugt, dass bei der Visualisierung der immunkompetenten Zellen unmittelbar erzeugte Farbbilder optisch vergrößert und in Bildpunkte zerlegt werden, die von einem Lesegerät getrennt erfasst und ausgewertet werden. Die Bildpunkte können als Zeilen abgelesen werden. Ein Computer kann dann aus den erhaltenen linearen Werten ein zweidimensionales Bild zusammensetzen. Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens werden zur Messung der immunkompetenten Zellen vorzugsweise zumindest zwei bei der Visualisierung

erzeugte zweidimensionale Bilder übereinander gelegt. Durch das Übereinanderlegen der Bilder, welches insbesondere mit Hilfe einer geeigneten Software erfolgen kann, können mit besonderem Vorteil die zu messenden immunkompetenten Zellen identifiziert und so von anderen Zellen unterschieden werden.

**[0022]** Grundsätzlich kann zur Visualisierung der immunkompetenten Zellen die Anzahl von auf einer Untersuchungsfläche auftretenden Spots bestimmt werden. Alternativ oder in Kombination dazu wird bevorzugt die Farbintensität einzelner Spots oder überlappender Spots, gegebenenfalls auch von Färbungen, die die gesamte Untersuchungsfläche bedecken, quantitativ gemessen. Besonders bevorzugt wird die Untersuchungsfläche in eine Vielzahl von Einzelpunkten zerlegt, die Farbintensität jedes Einzelpunktes getrennt gemessen und die gemessenen Intensitätswerte addiert. Erfindungsgemäß kann es insbesondere vorgesehen sein, dass 1 bis 2 Millionen, insbesondere ca. 1,5 Millionen, Bildpunkte (Pixel) pro Untersuchungsfläche erfasst werden. Die Erfassung der Bildpunkte kann beispielsweise mit Hilfe einer Kamera erfolgen. Für die Messung der Farbintensität eines Einzelpunktes auf der Untersuchungsfläche stehen mit besonderem Vorteil zwischen 200 und 300, insbesondere zwischen 220 und 260, vorzugsweise ca. 256 Abstufungen (Grauwerte) zur Verfügung. Die Verarbeitung und Auswertung der Bildpunkte kann beispielsweise mit einem Lesegerät vorgenommen werden. Vorzugsweise wird die Gesamtzahl der Bildpunkte sowie insbesondere ihre Intensität mit Hilfe eines sogenannten Image-Analyzers gemessen. Dadurch ist eine Messung der gesamten Färbung, bezogen auf die Untersuchungsfläche oder einen bestimmten Teil davon, möglich. Als Referenzwert kann eine ungefärbte Stelle auf der Untersuchungsfläche, gegebenenfalls auch einer anderen Untersuchungsfläche, dienen. Das Maß für die Gesamtaktivität, d. h. die Gesamtintensität der Reaktionen aller Blutzellen auf der Untersuchungsfläche auf ein definiertes Antigen, ergibt sich dann aus der Anzahl der angeregten (gefärbten) Pixel, multipliziert mit dem Farbwert (beispielsweise Graustufe zwischen 0 und 256) jedes angeregten Pixels. Dieses Produkt wird zweckmäßigerweise durch 1000 geteilt, um einfach handhabbare Zahlenwerte (Einheiten) zu erhalten. Die Erfassung und Auswertung der Bildpunkte erfolgt vorzugsweise von oben, d. h. oberhalb der Untersuchungsfläche. Die Verarbeitung zu einem zweidimensionalen Bild erfolgt, wie bereits erwähnt, gewöhnlich mit Hilfe von Computertechniken.

**[0023]** Gewöhnlich werden für den Inkubationsschritt eukaryotische Zellen humanen oder tierischen Ursprungs verwendet. Bevorzugt kommen humane Zellen zum Einsatz. Die eukaryotischen Zellen stammen in der Regel aus einem biologischen Untersuchungsmaterial. Bei dem Untersuchungsmaterial

kann es sich insbesondere um Körperflüssigkeiten, beispielsweise Blut, Lymphe, Gelenkflüssigkeit und/oder Schleimabsonderungen handeln. Bei dem Untersuchungsmaterial kann es sich zum Beispiel um eine Blutprobe, einen Cervix-Abstrich oder um eine Bronchiallavage handeln. Blutproben werden bevorzugt verwendet. Entsprechend ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass Blutzellen als eukaryotische Zellen verwendet werden. Bei den Blutzellen kann es sich insbesondere um B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Granulozyten, dendritische Zellen, Makrophagen und/oder Erythrozyten handeln.

**[0024]** Vorzugsweise werden die eukaryotischen Zellen vor der Inkubation mit dem Antigen angereichert, beispielsweise von Erythrozyten befreit. Die Anreicherung der eukaryotischen Zellen kann mit Hilfe der hierfür üblicher Weise zur Verfügung stehenden zellulären Anreicherungstechniken durchgeführt werden. Beispielsweise können die eukaryotischen Zellen durch Zentrifugation, insbesondere Gradienten-Zentrifugation, angereichert werden. Für die Gradienten-Zentrifugation können beispielsweise Zucker-Gradienten verwendet werden. In einer weitergehenden Ausführungsform werden die eukaryotischen Zellen, vorzugsweise vor der Inkubation mit dem Antigen, von Blutserum, insbesondere autologem Blutserum, befreit. Dies geschieht gewöhnlich ausgehend von einer gewonnenen Blutprobe durch Abtrennung des flüssigen Blutanteils von zellulären Bestandteilen. Bezüglich der zellulären Bestandteile und geeigneter Abtrennungstechniken wird auf die in diesem Absatz gemachten Angaben Bezug genommen.

**[0025]** Das erfindungsgemäße Verfahren wird gewöhnlich auf einer hierfür geeigneten Untersuchungsfläche, insbesondere in einem Untersuchungsgefäß, durchgeführt. Bei der Untersuchungsfläche kann es sich beispielsweise um Loch- oder Vertiefungsböden (Wells) von sogenannten Loch- oder Mikrotiterplatten handeln. Derartige Loch- bzw. Mikrotiterplatten sind kommerziell erhältlich, insbesondere mit unterschiedlichen Loch- bzw. Vertiefungszahlen. So kann das erfindungsgemäße Verfahren beispielsweise mit Hilfe einer 96-Lochplatte durchgeführt werden. Pro Loch der Mikrotiterplatte können bis zu einer Million Zellen eingesetzt werden. Im Blut sind eine Million Zellen gewöhnlich in einem Milliliter Blut enthalten, so dass im Falle einer 96-Lochplatte ca. 96 ml eingesetzt werden können. Die Mikrotiterplatten können weiterhin einen Vertiefungsdurchmesser von ca. 5 mm aufweisen, was einer Grundfläche von etwa 20 mm<sup>2</sup> entspricht. Die verwendete Untersuchungsfläche ist zweckmäßigerweise eben. Dadurch können lokale Konzentrationsunterschiede bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens vermieden werden. Außerdem eignen sich ebene Untersuchungsflächen grundsätzlich besser für die Erzeugung von zellulären Einfach-

schichten (Monolager). Typische Materialien, aus denen geeignete Untersuchungsgefäße bestehen können, sind beispielsweise Polystyrol, Polyvinylidendifluorid (PVDF), Nitrocellulose und Nylon.

**[0026]** In einer bevorzugten Ausführungsform werden zur Messung der immunkompetenten Zellen zumindest zwei verschiedene Abfangmoleküle und zumindest zwei verschiedene Detektionsmoleküle eingesetzt. Die Abfang- und Detektionsmoleküle sind vorzugsweise jeweils spezifisch für eines der ausgeschiedenen Zytokine. Typischerweise wird pro ausgeschiedenes Zytokin ein Abfangmolekül und ein entsprechendes Detektionsmolekül verwendet. Die Abfang- und Detektionsmoleküle binden gewöhnlich an verschiedenen Stellen der ausgeschiedenen Zytokine. Dadurch werden in der Regel ternäre Komplexstrukturen aus Abfangmolekülen, ausgeschiedenen Zytokinen und Detektionsmolekülen gebildet. Als Abfang- und Detektionsmoleküle werden in der Regel Antikörper, sogenannte Abfang-Antikörper und Detektions-Antikörper, eingesetzt. Bei den Abfang- und/oder Detektionsmolekülen kann es sich insbesondere um mono- und/oder polyklonale Antikörper handeln. Monoklonale Antikörper sind bevorzugt. Vorzugsweise sind die im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens einsetzbaren Detektionsmoleküle jeweils mit einem der Farbstoffe markiert. Die Markierung beruht meistens auf kovalenten Bindungen. Gewöhnlich bilden die Detektionsmoleküle eine Konjugatverbindung mit den Farbstoffen, wobei die Detektionsmoleküle und die Farbstoffe vorzugsweise kovalent miteinander verbunden sind.

**[0027]** Erfindungsgemäß kann es weiterhin vorgesehen sein, dass die Anzahl an immunkompetenten Zellen gemessen wird, die zumindest zwei verschiedene Zytokine aus der Gruppe Interferone, Interleukine, koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine ausscheiden. Insbesondere wird die Anzahl an immunkompetenten Zellen gemessen, die zumindest ein Interferon und zumindest ein Interleukin ausscheiden.

**[0028]** Vorzugsweise werden im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens immunkompetente Zellen gemessen, die sowohl Interferon- $\gamma$  als auch Interleukin-2 ausscheiden. Bevorzugt handelt es sich bei diesen Zellen um T-Zellen (T-Lymphozyten), insbesondere T<sub>H1</sub>-Zellen, vorzugsweise davon abgeleitete Gedächtniszellen. Überraschenderweise konnte nun festgestellt werden, dass dieser Zelltyp während den verschiedenen Phasen einer Infektion in unterschiedlichen Mengen in Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut, anwesend ist. So konnten große Mengen dieses Zelltyps vor allem in Blutproben von Testpersonen ermittelt werden, die entweder an einer latenten Infektion litten oder aber bei denen bereits eine Infektion über einen längeren Zeitraum abgeklungen war, so dass die Infektion im Wesentlichen als überstanden

angesehen werden konnte. Typischerweise wiesen die Blutproben dieser Personen einen Anteil zwischen 30 und 50% oder mehr des besagten Zelltyps auf, bezogen auf die in der Probe enthaltene Gesamtzahl an Zellen. Dagegen wiesen Blutproben von Personen, die an einer akuten Infektion litten, einen deutlich geringeren Anteil des fraglichen Zelltyps auf. In der Regel wiesen mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens untersuchte Blutproben von Testpersonen mit einer akuten Infektion einen Anteil des fraglichen Zelltyps zwischen 10 und 20% auf, bezogen auf die in der Blutprobe enthaltene Gesamtzahl an Zellen. Somit eignet sich die Messung von immunkompetenten Zellen, welche sowohl Interferon- $\gamma$  als auch Interleukin-2 ausscheiden, in besonders vorteilhafter Weise für eine Beurteilung des Immunstatus, insbesondere zur Unterscheidung zwischen akuten Infektionen einerseits und latenten oder überstandenen Infektionen andererseits. Zusätzlich eignet sich die Messung von immunkompetenten Zellen, welche Interferon- $\gamma$  und Interleukin-2 ausscheiden, zur Impfkontrolle. Können viele Zellen dieses Zelltyps nachgewiesen werden, bedeutet dies einen guten Impfstatus.

**[0029]** Als mögliche Antigene können im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens grundsätzlich alle Fremdstoffe, insbesondere Allergene, Mitogene und/oder Erregertypen, verwendet werden. Bevorzugt wird für die Inkubation der eukaryotischen Zellen zumindest ein Erregertyp, insbesondere zumindest ein Infektionserregertyp, als Antigen verwendet. Die in Betracht kommenden Antigene sind in aller Regel mikrobiellen Ursprungs, insbesondere bakteriellen, viralen und/oder fungiden Ursprungs. Als mögliche Antigene viralen Ursprungs können grundsätzlich Epstein-Barr-Viren, Zytomegalie-Viren, Influenza-Viren, Herpes-Simplex-Viren, Mumps-Viren, Rubella-Viren, Adenoviren, Enteroviren, Coxsackie-Viren, Varizella-Zoster-Viren und/oder Hepatitis-Viren verwendet werden. Bevorzugt werden Fragmente von Erregertypen, insbesondere Erregerepitope als Antigene verwendet. Bei den Epitopen handelt es sich insbesondere um Peptide, vorzugsweise Oligopeptide. Geeignete Epitope können aus 5 bis 25, insbesondere 9 bis 11, Aminosäureeinheiten aufgebaut sein. In einer bevorzugten Ausführungsform werden zur Inkubation der eukaryotischen Zellen zumindest ein Antigen aus der Gruppe PPD, RD 1, RD 2, ESAT 6, CFP 10, MPT 41, MTB 64, PPE 44, OSP A, OSP B, OSP C, OSP D, OSP E, VIsE, p58, p 100 Dbp A, HPV L1, HPV E1 bis E7, Influenza H1 bis H15, HCV, HBV core AG NS2-6, Chlamydien MOMP1 und 2 verwendet.

**[0030]** Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird zur Inkubation der eukaryotischen Zellen zumindest ein Tuberkulose spezifisches Antigen, insbesondere aus der Gruppe PPD, RD 1, RD 2, MPT 64, MTB 41 und PPE 44, eingesetzt. In einer

weiteren bevorzugten Ausführungsform wird zur Inkubation der eukaryotischen Zellen zumindest ein Borreliose spezifisches Antigen, insbesondere aus der Gruppe VIsE, OSP A, OSP B, OSP C, OSP D und OSP E, verwendet.

**[0031]** Bei den Infektionen bzw. Infektionserkrankungen, welche mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens in vitro diagnostiziert bzw. deren Therapieverlauf in vitro überwacht werden kann, handelt es sich insbesondere um Tuberkulose, Borreliose, Influenza, Hepatitis A bis E, Herpes-Simplex und/oder um durch Zytomegalie-Viren (ZMV), Epstein-Barr-Viren (EBV) und/oder um durch Papilloma-Viren, insbesondere humane Papilloma-Viren (HPV), verursachte Infektionen und/oder Infektionserkrankungen.

**[0032]** Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich darüber hinaus vorzugsweise zur Beurteilung des Immunstatus, insbesondere zur Unterscheidung zwischen akuten Infektionen einerseits und latenten oder überstandenen Infektionen andererseits. Wie bereits erwähnt, konnte erfindungsgemäß gezeigt werden, dass akute Infektionen durch eine geringe Anzahl von immunkompetenten Zellen charakterisiert sind, welche sowohl Interferon- $\gamma$  als auch Interleukin-2 ausscheiden (sezernieren), insbesondere im Verhältnis zu Zellen, die nur Interferon- $\gamma$  ausscheiden. Bei latenten Infektionen liegen die Verhältnisse dagegen gerade umgekehrt.

**[0033]** Je nach Infektion bzw. Infektionserkrankung sind unterschiedliche Bezeichnungen für den Infektionsstatus gebräuchlich. So spricht man beispielsweise im Falle der Tuberkulose von akuten und latenten Infektionen bzw. Infektionserkrankungen. Akute Tuberkulose stellt ein aktives Stadium der Erkrankung dar. Patienten, die an einer akuten Tuberkulose leiden, produzieren Tuberkulose-Erreger und sind infektiös. Latente Tuberkulose-Infektionen sind in diesem Kontext nicht infektiös. Es sind gewöhnlich zumindest direkt keine Tuberkulose-Erreger nachweisbar. Bei der Borreliose werden dagegen normalerweise die Bezeichnungen aktive und chronische Infektionen bzw. Infektionserkrankungen verwendet. Erfindungsgemäß ist es besonders bevorzugt, dass die Überprüfung des Immunstatus durch Messung der bereits erwähnten immunkompetenten Zellen vorgenommen wird, welche sowohl Interferon- $\gamma$  als auch Interleukin-2 in Gegenwart eines Antigens ausscheiden. Weiterhin eignet sich das Verfahren auch zur Impfprognose oder zur Beurteilung des Impfstatus. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens kann daher mit besonderem Vorteil überprüft werden, ob ein ausreichender Impfschutz besteht oder gegebenenfalls eine Nachimpfung erforderlich ist. Bezüglich weiterer Merkmale und Einzelheiten wird daher auf die bisherige Beschreibung verwiesen.

**[0034]** Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich

noch einen ELISPOT-Kit, insbesondere zur in vitro-Diagnose und/oder in vitro-Therapieüberwachung von Infektionen und/oder Infektionserkrankungen, wobei der Kit zumindest eine Komponente zum Messen von immunkompetenten Zellen aufweist, die in Gegenwart eines Antigens zumindest zwei verschiedene Zytokine ausscheiden. Als mögliche Komponenten für den erfindungsgemäßen Kit kommen vor allem geeignete Untersuchungsgefäße, Abfangmoleküle, Detektionsmoleküle, Antigene, Farbstoffe und Filtersätze mit Schmalbandfilter in Betracht. Bezüglich weiterer Merkmale und Einzelheiten bezüglich dieser Komponenten wird auf die bisherige Beschreibung Bezug genommen.

**[0035]** Weitere Einzelheiten und Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung der Darstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens anhand von zwei Beispielen in Verbindung mit den Unteransprüchen. Hierbei können die jeweiligen Merkmale für sich alleine oder zu mehreren in Kombination miteinander verwirklicht sein.

#### Beispiel 1:

##### Nachweis von Tuberkulose-Erreger

**[0036]** Zur Durchführung des Verfahrens wird eine 96-Lochplatte verwendet. Zunächst werden Anti-Antikörper als Abfangmoleküle aus den Böden der Vertiefungen der Lochplatte immobilisiert. Die verwendeten Anti-Antikörper sind dabei spezifisch gegen die Antikörper von Tuberkulose-Erreger spezifische Antikörper sezernierenden Zellen gerichtet. Danach wird PPD als Tuberkulose-Erreger auf dem Boden der Vertiefungen immobilisiert. Zusätzlich oder alternativ dazu können auch Peptide vom sogenannten RD1- und RD2-Komplex benutzt werden. Des Weiteren können auch weitere Proteine von Mycobacterium Tuberculosis (38 kD, 41 kD, 44 kD, 64 kD) eingesetzt werden. Anschließend werden pro Vertiefung 100.000 bis 250.000 PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) hinzugegeben. Die Inkubation der Blutzellen (zusammen mit den Tuberkulose-Erregern) wird während eines Zeitraums von ca. 18 Stunden bei ca. 37°C vorgenommen. Danach werden die Zellen dekantiert und die Lochplatte mehrfach gewaschen. Anschließend wird ein gegen Interleukin- $\gamma$  gerichteter Antikörper, der mit Fluoreszeinisothiocyanat kovalent markiert ist, und ein gegen Interleukin-2 gerichteter Antikörper, der mit Cy3 kovalent markiert ist, hinzugegeben. Es wird eine erneute Inkubation bei ca. 37°C während 4 bis 12 Stunden vorgenommen. Anschließend werden nicht gebundene Farbstoff markierte Antikörper von dem Lochplattenboden der 96-Lochplatte ab gespült. Es werden dann die Fluoreszenzen der Farbstoffe gemessen. Zu diesem Zweck werden pro Loch der Lochplatte zwei Bilder erzeugt, eines im grünen Spektralbereich (grüne Fluoreszenz von Fluoreszeinisothiocyanat) und eines im

roten Spektralbereich (rote Fluoreszenz von Cy3). Dadurch wird gewährleistet, dass weder schwache grüne noch schwache rote Fluoreszenzen durch entsprechende starke rote bzw. starke grüne Fluoreszenzen überlagert werden. Anschließend werden die Bilder übereinander gelegt. Dadurch können immunkompetente Zellen identifiziert und insbesondere quantifiziert werden, die sowohl Interferon- $\gamma$  als auch Interleukin-2 ausscheiden. Beträgt der Anteil der Zellen, die sowohl Interferon- $\gamma$  als auch Interleukin-2 ausscheiden, weniger als 30%, bezogen auf die Gesamtzahl der insgesamt untersuchten Zellen, stammen die Zellen von Patienten, die an einer akuten Tuberkulose leiden. Liegt der Anteil dieses Zelltyps über 30%, insbesondere über 30 bis 50% oder mehr, so stammen die Zellen insgesamt von Patienten, die entweder an einer latenten Tuberkulose-Infektion leiden oder von Patienten mit einer bereits überstandenen Infektion.

#### Beispiel 2:

##### Nachweis von Borrelien

**[0037]** Zur Durchführung des Verfahrens wird eine 96-Lochplatte verwendet. Auf den Böden der Vertiefungen der Lochplatte werden Anti-Antikörper immobilisiert, die spezifisch gegen die Antikörper von Borrelien spezifische Antikörper sezernierenden Zellen gerichtet sind. Anschließend werden Borrelien spezifische Antigene, beispielsweise die Peptide OSP A, OSP B, OSP C und/oder VlsE inneres Flaggelin Fragment benutzt. Die Borrelien spezifischen Antigene werden mit einer Konzentration von 1 bis 10  $\mu\text{g/ml}$  auf den Böden der Vertiefungen gekoppelt. Danach werden pro Vertiefungen 100.000 bis 250.000 PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) hinzugegeben. Die Blutzellen werden (zusammen mit den Borrelien spezifischen Antigenen) während eines Zeitraums von ca. 18 Stunden bei ca. 37°C inkubiert. Danach werden die Blutzellen dekantiert und die Lochplatte mehrfach gewaschen. Anschließend wird ein gegen Interleukin- $\gamma$  gerichteter Antikörper, der mit Fluoreszeinisothiocyanat kovalent markiert ist, und ein gegen Interleukin-2 gerichteter Antikörper, der mit Cy3 kovalent markiert ist, hinzugegeben. Es wird eine erneute Inkubation bei ca. 37°C während 4 bis 12 Stunden vorgenommen. Anschließend werden nicht gebundene Farbstoff markierte Antikörper von dem Lochplattenboden der 96-Lochplatte ab gespült. Es werden dann die Fluoreszenzen der Farbstoffe, wie unter Beispiel 1 beschrieben, gemessen. Beträgt der Anteil der Zellen, die sowohl Interferon- $\gamma$  als auch Interleukin-2 ausscheiden, weniger als 30%, bezogen auf die Gesamtzahl der insgesamt untersuchten Zellen, stammen die Zellen von Patienten, die an einer aktiven Borreliose leiden. Liegt der Anteil dieses Zelltyps über 30%, insbesondere über 30 bis 50% oder mehr, so stammen die Zellen insgesamt von Patienten, die entweder an einer chronischen Borrelio-

se-Infektion leiden oder von Patienten mit einer bereits überstandenen Infektion.

Beispiel 3:

Nachweis einer akuten HPV Infektion aus einem Cervixabstrich

**[0038]** Zur Durchführung des Verfahrens wird eine 96-Lochplatte verwendet. Auf den Böden der Vertiefungen der Lochplatte werden Anti-Antikörper immobilisiert, die spezifisch gegen die Antikörper von HPV spezifische Antikörper sezernierenden Zellen gerichtet sind. Als HPV spezifische Antigene werden HPV L1 und HPV E2 bis E7 verwendet. Die HPV spezifischen Antigene werden mit einer Konzentration von 1 bis 10 µg/ml auf den Böden der Vertiefungen gekoppelt. Danach werden pro Vertiefungen 100 bis 1000 Zellen eines gewaschenen Cervixabstriches hinzugegeben. Die Zellen werden (zusammen mit den HPV spezifischen Antigenen) während eines Zeitraums von ca. 18 Stunden bei ca. 37°C inkubiert. Danach werden die Zellen dekantiert und die Lochplatte mehrfach gewaschen. Anschließend wird ein gegen Interleukin-γ gerichteter Antikörper, der mit Fluoreszeinisothiocyanat kovalent markiert ist, und ein gegen Interleukin-2 gerichteter Antikörper, der mit Cy3 kovalent markiert ist, hinzugegeben. Es wird eine erneute Inkubation bei ca. 37°C während 4 bis 12 Stunden vorgenommen. Anschließend werden nicht gebundene Farbstoff markierte Antikörper von dem Lochplattenboden der 96-Lochplatte abgespült. Es werden dann die Fluoreszenzen der Farbstoffe, wie unter Beispiel 1 beschrieben, gemessen. Beträgt der Anteil der Zellen, die sowohl Interferon-γ als auch Interleukin-2 ausscheiden, weniger als 30%, bezogen auf die Gesamtzahl der insgesamt untersuchten Zellen, stammen die Zellen von Patienten, die an einer akuten/aktiven HPV-Infektion leiden. Liegt der Anteil dieses Zelltyps über 30%, insbesondere über 30 bis 50% oder mehr, so stammen die Zellen insgesamt von Patienten, die entweder an einer gegebenenfalls bereits über Monate persistierenden Infektion leiden oder von Patienten mit einer bereits überstandenen Infektion.

**[0039]** Die in den Beispielen 1 bis 3 durchgeführten Fluoreszenzmessungen werden jeweils mit zwei Filtersätzen durchgeführt, die jeweils aus einem Schmalband-Anregungsfilter und einem Schmalband-Sperrfilter zusammengesetzt sind. Bei den verwendeten Filtern handelt es sich um reine Interferenzfilter.

**[0040]** Der eine Filtersatz enthält einen Schmalband-Anregungsfilter mit einer Durchlässigkeit zwischen 460 und 500 nm und einen Schmalband-Sperrfilter mit einer Durchlässigkeit zwischen 512 und 542 nm. Diese Schmalbandfilter sind an die spektralen Eigenschaften von Fluoreszeinisothiocya-

nat angepasst.

**[0041]** Der andere Filtersatz enthält einen Schmalband-Anregungsfilter mit einer Durchlässigkeit zwischen 541 und 551 nm und einen Schmalband-Sperrfilter mit einer Durchlässigkeit zwischen 572 und 647 nm. Diese Schmalbandfilter sind komplementär zu den spektralen Eigenschaften von Cyanine 3.



**ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**Zitierte Patentliteratur**

- EP 0957359 A2 [[0003](#), [0004](#)]

**Patentansprüche**

1. ELISPOT-Verfahren, insbesondere zur in vitro-Diagnose und/oder in vitro-Therapieüberwachung von Infektionen und/oder Infektionserkrankungen, wobei eukaryotische Zellen mit einem Antigen inkubiert werden und die Anzahl an immunkompetenten Zellen gemessen wird, die zumindest zwei verschiedene Zytokine als Reaktion auf das Antigen ausscheiden, wobei zur Messung der immunkompetenten Zellen diese zumindest mit Hilfe von zwei verschiedenen Farbstoffen und zumindest zwei verschiedenen Filtersätzen visualisiert werden, wobei die Filtersätze Schmalbandfilter aufweisen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass pro Filtersatz Schmalbandfilter verwendet werden, die jeweils komplementär zu den spektralen Eigenschaften eines der Farbstoffe sind.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass zur Visualisierung Filtersätze verwendet werden, die ausschließlich Schmalbandfilter aufweisen.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass pro Filtersatz mit zwei Schmalbandfiltern gearbeitet wird.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass pro Filtersatz mit verschiedenen Schmalbandfiltertypen gearbeitet wird.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass pro Filtersatz ein Schmalband-Anregungsfilter und ein Schmalband-Sperrfilter verwendet wird.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass in den Filtersätzen verschiedene Schmalband-Anregungsfilter verwendet werden, insbesondere Schmalband-Anregungsfilter, die für verschiedene, vorzugsweise sich im Wesentlichen nicht überlappende, Wellenlängenbereiche des Lichts durchlässig sind.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass in den Filtersätzen verschiedene Schmalband-Sperrfilter verwendet werden, insbesondere Schmalband-Sperrfilter, die für verschiedene, vorzugsweise sich im Wesentlichen nicht überlappende, Wellenlängenbereiche des Lichts durchlässig sind.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Visualisierung der immunkompetenten Zellen mit zwei Filtersätzen gearbeitet wird, insbesondere einem Filtersatz mit Schmalbandfilter für Fluoreszeinisothiocy-

anin und einem Filtersatz mit Schmalbandfilter für Cyanine 3.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Messung der immunkompetenten Zellen zumindest zwei bei der Visualisierung erzeugte zweidimensionale Bilder übereinandergelegt werden.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Messung der immunkompetenten Zellen zumindest zwei verschiedene Abfangmoleküle und zumindest zwei verschiedene Detektionsmoleküle eingesetzt werden.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Messung der immunkompetenten Zellen zumindest zwei Detektionsmoleküle eingesetzt werden, die jeweils mit einem der Farbstoffe markiert sind.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Anzahl an immunkompetenten Zellen gemessen wird, die zumindest zwei Zytokintypen aus der Gruppe Interferone, Interleukine, Koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren, Chemokine und Lymphokine ausscheiden.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Anzahl an immunkompetenten Zellen gemessen wird, die zumindest ein Interferon und zumindest ein Interleukin ausscheiden.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Anzahl an immunkompetenten Zellen, insbesondere T-Zellen, vorzugsweise  $T_{H1}$ -Zellen, gemessen wird, die Interferon- $\gamma$  und Interleukin-2 ausscheiden.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Inkubation der eukaryotischen Zellen zumindest ein Erregertyp, insbesondere ein Infektionserregertyp, vorzugsweise ein Epitop davon, als Antigen verwendet wird.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Inkubation der eukaryotischen Zellen zumindest ein Antigen aus der Gruppe PPD, RD 1, RD 2, ESAT 6, CFP 10, MPT 41, MTB 64, PPE 44, OSP A, OSP B, OSP C, OSP D, OSP E, VIsE, p 58, p 100 Dbp A, HPV L1, HPV E1 bis E7, Influenza H1 bis H15, HCV, HBV core AG NS2-6, Chlamydien MOMP1 und 2 eingesetzt wird.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden

Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Inkubation der eukaryotischen Zellen zumindest ein Tuberkulose spezifisches Antigen, zumindest ein Antigen aus der Gruppe PPD, RD 1, RD 2, MPT 64, MTB 41 und PPE 44, verwendet wird.

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Inkubation der eukaryotischen Zellen zumindest ein Borreliose spezifisches Antigen, insbesondere zumindest ein Antigen aus der Gruppe VlsE, OSP A, OSP B, OSP C, OSP D und OSP E, eingesetzt wird.

20. Verwendung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Überprüfung des Infektionsstatus, insbesondere zur Unterscheidung zwischen akuten Infektionen einerseits und latenten oder überstandenen Infektionen andererseits.

21. Verwendung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 19 zur Impfprognose.

22. ELISPOT-Kit, insbesondere zur in vitro-Diagnose und/oder in vitro-Therapieüberwachung, umfassend zumindest eine Komponente zum Messen von immunkompetenten Zellen, die in Gegenwart eines Antigens zumindest zwei verschiedene Zytokine ausschcheiden.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen