

Aus dem Forschungszentrum Borstel  
der Universität zu Lübeck  
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften  
- Abteilung Klinische Medizin -  
Direktor: Prof. Dr. med. P. Zabel

---

**Evaluation eines neuen Testverfahrens zur Diagnose einer  
Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis***

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

**- Aus der medizinischen Fakultät -**

vorgelegt von

Gabriele Döscher

aus Offenbach am Main

Lübeck 2007

1. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Lange

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. univ. (Univ. Budapest) Tamás Laskay

Tag der mündlichen Prüfung: 25.09.2007

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.09.2007

*Für meine Eltern und Max*

# Inhaltsverzeichnis

|   | Seite     |
|---|-----------|
| <b>1. Einleitung.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. Epidemiologie.....   | 1         |
| 1.2. Bacille-Calmette-Guérin (BCG)-Impfung.....                         | 2         |
| 1.3. Tuberkulin-Hauttest (THT).....                                     | 2         |
| 1.4. Pathogenese.....   | 4         |
| 1.5. Enzyme linked immunospot (ELISPOT)-Testverfahren.....              | 5         |
| 1.6. Ein Polizeischüler mit ansteckender Lungentuberkulose (Index-Fall) | 8         |
| 1.7. Fragestellung und Zielsetzung.....                                 | 9         |
| <br>  |           |
| <b>2. Material und Methoden.....</b>                                    | <b>10</b> |
| 2.1. Index-Fall und Kontaktpersonen.....                                | 10        |
| 2.2. Enzyme linked immunospot (ELISPOT).....                            | 11        |
| 2.3. Tuberkulin-Hauttest (THT).....                                     | 13        |
| 2.4. Nachtestung.....   | 13        |
| 2.5. Statistische Analyse.....  | 13        |
| <br>  |           |
| <b>3. Ergebnisse.....</b>   | <b>15</b> |
| 3.1. Exposition der Kontaktpersonen.....                                | 15        |
| 3.2. Ergebnisse der Hauttestungen.....                                  | 17        |
| 3.3. Testergebnisse ELISPOT.....  | 19        |
| 3.4. Korrelation des THT zum ELISPOT.....                               | 20        |
| 3.5. Auswertung der Fragebögen.....                                     | 22        |

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| <b>3.6.</b> | <b>Zusammenhang der Testergebnisse mit der Exposition und dem BCG</b> |           |
|             | -Impfstatus.....  | 23        |
| <b>3.7.</b> | <b>Nachtestung.....</b>   | <b>25</b> |
| <b>4.</b>   | <b>Diskussion.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>4.1.</b> | <b>Nachtestung.....</b>   | <b>40</b> |
| <b>4.2.</b> | <b>Kosteneffizienz des ELISPOT im Vergleich zum THT.....</b>          | <b>40</b> |
| <b>4.3.</b> | <b>Offene Fragen.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>4.4.</b> | <b>Fazit.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>5.</b>   | <b>Zusammenfassung.....</b>   | <b>44</b> |
| <b>6.</b>   | <b>Literaturverzeichnis.....</b>                                      | <b>46</b> |
| <b>7.</b>   | <b>Anhang.....</b>  | <b>52</b> |
| <b>8.</b>   | <b>Danksagung.....</b>  | <b>54</b> |
| <b>9.</b>   | <b>Lebenslauf.....</b>  | <b>56</b> |
| <b>9.1.</b> | <b>Publikationsverzeichnis.....</b>                                   | <b>57</b> |

## Verzeichnis der Abkürzungen

|               |   |
|---------------|---|
| ATS           | American Thoracic Society                               |
| BAL           | Bronchoalveoläre Lavage                                 |
| BALMC         | Bronchoalveoläre Lavage mononukleärer Zellen            |
| BCG           | Bacille Calmette Guérin                                 |
| CDC           | Centers for Disease Control and Prevention              |
| CFP-10        | Culture-filtrate-protein-10                             |
| DNS           | Desoxyribonukleinsäure                                  |
| DZK           | Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose |
| ELISA         | Enzyme-linked immuno-sorbent assay                      |
| ELISPOT       | Enzyme-linked immuno-spot assay                         |
| ESAT-6        | Early-secreted-antigenic-target-6                       |
| FCS           | Fetales Kälberserum                                     |
| HIV           | Humanes Immundefizienzvirus                             |
| IFN- $\gamma$ | Interferon- $\gamma$                                    |
| IGRA          | Interferon- $\gamma$ -Release Assay                     |
| INH           | Isoniazid   |
| LTBI          | Latente Infektion mit <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| MTB           | <i>Mycobacterium tuberculosis</i>                       |
| NAT           | Nukleinsäureamplifikation                               |
| NTM           | Nicht-tuberkulöse Mykobakterien                         |
| PBMC          | Periphere mononukleäre Zellen                           |
| PCR           | Polymerase-Kettenreaktion                               |
| PPD           | Purified-Protein-Derivate                               |
| PPW           | Positiver prädiktiver Wert                              |
| RD1           | Region of difference 1                                  |

|               |   |
|---------------|---|
| RPMI          | Roswell Park Memorial Institute Medium (Kulturmedium)   |
| TBC           | Tuberkulose   |
| THT           | Tuberkulin-Hauttest                                     |
| TNF- $\alpha$ | Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$                          |
| TU            | Tuberkulin Units  |
| WHO           | World-Health-Organisation (Weltgesundheitsorganisation) |

# 1. Einleitung

## 1.1. Epidemiologie

*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ist ein unbewegliches, nicht sporenbildendes, aerobes, stäbchenförmiges Bakterium (1). Der MTB-Komplex umfasst außerdem: *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. microti* und *M. pinnipedii*.

Die Organismen des MTB-Komplex sind die Erreger der Tuberkulose, wobei neben humanen Infektionen auch Paarhufer (*M. bovis*), Nagetiere (*M. microti*) und Robben (*M. pinnipedii*) als Reservoir dieser Bakterien dienen, (1, 2). Laut aktuellen Angaben der Weltgesundheitsorganisation (engl. World-Health-Organisation – WHO) sterben heute mehr Menschen an Tuberkulose, als jemals zuvor (3). In absoluten Zahlen sind das weltweit ca. 8000 Personen pro Tag, beziehungsweise ca. 2 bis 3 Millionen Individuen pro Jahr.

Schätzungsweise ein Drittel der Weltbevölkerung ist latent mit MTB infiziert (engl. latent TB Infection - LTBI). Die meisten dieser Individuen reagieren positiv im Tuberkulin-Hauttest (THT). Im Gegensatz zur aktiven Tuberkulose besteht bei diesen Personen aber keine Tuberkulose-Erkrankung (4). Fünf – 10 Prozent der Personen mit LTBI (ca. 8 Millionen Menschen pro Jahr) entwickeln im Laufe ihres Lebens dennoch eine aktive Tuberkulose-Erkrankung (5, 6). Das Risiko einer manifesten Erkrankung ist abhängig von der Virulenz der Bakterien, der individuellen Resistenzlage und ist in den beiden ersten post-infektiösen Jahren am höchsten (5, 7). Betroffen sind hauptsächlich Menschen in sogenannten Entwicklungsländern (8).

Vierzig Prozent der jährlich neu auftretenden Tuberkulose-Fälle stammen aus dem südostasiatischen Raum, wo im gleichen Zeitraum fast 1 Million Todesopfer durch Tuberkulose gemeldet werden (9). Klinische Symptome einer manifesten Tuberkulose sind Husten, Fieber, Inappetenz, Nachtschweiß und Gewichtsverlust (10).

In Europa befindet sich die Tuberkulose-Inzidenz seit Mitte des vergangenen Jahrhunderts im Rückgang. Von einer Entspannung der Lage kann zurzeit jedoch nicht ausgegangen werden, da die Bekämpfung der Krankheit durch zunehmende Multiresistenzen und durch die HIV-Koinfektion vor allem in Osteuropa erheblich behindert wird. Die Multiresistenzraten in den Ländern Mittel- und Osteuropas sowie der Gemeinschaft unabhängiger Staaten (GUS) zählen nach Schätzungen der WHO zu den höchsten der Welt (11, 12).



In Deutschland gibt es eine anhaltende Zuwanderung von Personen aus Ländern mit hoher Tuberkulose-Inzidenz. Im Jahr 2004 wurden dem Robert Koch-Institut 6583 Neuerkrankungen in Deutschland gemeldet, was einer Inzidenz von 8.0 pro 100 000 entspricht (13). Verglichen mit den Inzidenzraten der Jahre 2003 (8.7) und 2002 (9.3) zeigt sich für Deutschland weiterhin ein rückläufiger Trend (13, 14). Der Anteil multiresistenter Stämme (mind. Resistenz gegenüber Isoniazid und Rifampizin) ist in den vergangenen Jahren jedoch von 1.2 Prozent auf 2.0 Prozent angestiegen (15).

## **1.2 Bacille-Calmette-Guérin (BCG) - Impfung**

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wurde eine Schutzimpfung gegen die Tuberkulose entwickelt. Der Impfstoff besteht aus lebenden, attenuierten Bakterien von *Mycobacterium bovis*, Stamm Bacille-Calmette-Guérin (BCG). Die BCG-Impfung ist aktuell die weltweit am häufigsten verwendete Vakzine überhaupt (16). Die Impfung kann bei Kindern schwere Verlaufsformen, wie eine tuberkulöse Meningitis verhindern (17), bietet jedoch keinen Schutz vor einer Erkrankung im Erwachsenenalter und wird z. B. im Niedrig-Inzidenzland Deutschland von der ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert-Koch-Institut seit 1998 nicht mehr empfohlen.

Dies entspricht den Empfehlungen der WHO, die vorgeschlagen hat, in Populationen, deren Infektionsrisiko für Tuberkulose unter 0.1 Prozent liegt, keine generelle BCG-Impfung durchzuführen (10). Eine erfolgreich durchgeführte BCG-Impfung führt in der Regel nach 6-8 Wochen zu einem positivem THT.

Bezüglich der Zeitspanne, über die nach einer BCG-Impfung der Hauttest positiv bleibt, existieren unterschiedliche Angaben. *De facto* kann man nicht von einer linearen Beziehung zwischen Zeit und positiver THT-Reaktion ausgehen (18).

## **1.3 Tuberkulin-Hauttest (THT)**

Felix Mendel und Charles Mantoux führten zu Beginn des 20. Jahrhunderts den THT in Deutschland und Frankreich ein (19, 20).

Der Test ist bis heute die Standard-Untersuchung zur Diagnostik einer Infektion mit MTB. Eine positive Reaktion im THT unterscheidet allerdings nicht zwischen einer LTBI und einer aktiven Tuberkulose. In der Bundesrepublik Deutschland ist seit August 2005 für den THT das Tuberkulin RT 23 SSI des Statens Serum Instituts (Kopenhagen, Dänemark)

zugelassen. Die Standarddosis des RT 23 Tuberkulins beträgt 2 TU/0.1 ml. Diese Dosierung entspricht 10 Einheiten des bis dahin verwendeten GT 10 Behring und 5 internationalen Einheiten des in den USA verwendeten Purified Protein Derivative-Standard (PPD-S) in einem Volumen von 0.1 ml (21). Die Testung erfolgt nach der von Mendel und Mantoux beschriebenen Methode (19, 20) mittels streng intradermaler Injektion an der Volarseite des Unterarmes<sup>46</sup>. Die Reaktion beginnt 5 – 6 Stunden nach Injektion und erreicht nach 48 – 72 Stunden ihr Maximum. Bei stärkerer Reaktion kann es auch zu Blasenbildung und Nekrosen kommen. Die Induration sollte nach 48 – 72 Stunden quer zur Unterarmachse (z. B. mit der Kugelschreiber-Methode, (22, 23)) gemessen werden (24, 25). Nur die Induration, nicht das Erythem, wird als spezifische Reaktion gewertet und gemessen. Eine positive Reaktion im THT zeigt die immunologische Auseinandersetzung des Organismus mit den Mykobakterien an. Bei bestehendem immunologischem Gedächtnis gegenüber MTB können nach Kontakt mit einem MTB-spezifischen Antigen MTB-spezifische T-Zellen (Gedächtniszellen) proliferieren (26) und eine Allergie vom Spättyp auslösen (27, 28). Eine Infektion mit MTB führt in der Regel nach 2 – 12 Wochen zu einem positiven Testergebnis (21).

Die Kriterien der Interpretation eines positiven Testergebnisses variieren, je nachdem welcher Risikogruppe der Proband angehört. Bei Personen der Hochrisikogruppen, die z.B. Kontakt zu Personen mit ansteckender Tuberkulose hatten, Personen mit einer Infektion mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) und bei anderen Immunsupprimierten gilt eine Induration größer als 5 Millimeter beim THT als positiv (29, 30).

Bei Personen aus Ländern mit hoher Tuberkulose-Prävalenz, i.v. Drogenabhängigen, Bewohnern von Hochrisikoeinrichtungen wie Gefängnissen, Krankenhäusern etc. gilt eine Induration größer als 10 Millimeter als positiv (29, 30).

Bei Fehlen von Risikofaktoren, bewertet man eine Induration größer als 15 Millimeter als positiv (29, 30). Der THT liefert nur eine indirekte Diagnose einer LTBI und kann in Populationen mit hoher Rate an BCG-geimpften Personen oder bei Infektionen mit nicht-tuberkulösen Mykobakterien (NTM) zu falsch-positiven Testergebnissen führen (31-36). Nachteile des THT sind, dass die Patienten nach 48 – 72 Stunden erneut zum Ablesen erscheinen müssen. Die Interpretation der Hautveränderung ist außerdem schwierig und unterliegt, je nach Untersucher, individuellen Schwankungen und damit großer Subjektivität, was Auswirkungen auf die Spezifität und Sensitivität des Testergebnisses hat (31, 36, 37).

Die Wahrscheinlichkeit einer wahren Infektion mit MTB wird durch den positiven prädiktiven Wert ( $PPW = \text{Sensitivität} \times \text{Prävalenz} / (\text{Sensitivität} \times \text{Prävalenz} + (1 - \text{Spezifität}) \times (1 - \text{Prävalenz}))$ ) eines Testergebnisses beschrieben.

Bei einer angenommenen Sensitivität und Spezifität von jeweils 95 Prozent und der Prävalenz einer tuberkulösen Infektion von 30 Prozent (etwa bei engen Kontaktpersonen eines mikroskopisch positiven Patienten mit Lungentuberkulose), beträgt der positive prädiktive Wert eines Tests 89 Prozent, d.h., dass bei 11 Prozent der als positiv getesteten Personen keine Infektion mit MTB vorliegt (24).

Sinkt die Prävalenz bei ansonsten gleichen Voraussetzungen auf 1 Prozent, dann beträgt der prädiktive Wert eines positiven Tests nur noch 16 Prozent, was bedeutet, dass bei 84 Prozent aller Testpersonen ein falsch-positives Ergebnis vorliegt (24). Daraus resultiert, dass der PPW nur dort einen guten prädiktiven Wert anzeigt, wo die Wahrscheinlichkeit einer Infektion im Vergleich zur Gesamtpopulation deutlich erhöht ist. Die Spezifität verschlechtert sich zusätzlich durch Kreuzreaktionen aufgrund einer vorangegangenen BCG-Impfung oder durch NTM, was den PPW ebenfalls schwächt.

Als Fazit lässt sich daraus folgern, dass in Populationen mit hoher Infektions-Prävalenz, wie z.B. bei Zuwanderern aus Gebieten mit hoher Tuberkulose-Inzidenz, ein positives Testergebnis einen hohen prädiktiven Wert anzeigt. Andererseits ist der THT als Screening-Methode bei nicht-Risiko Patienten in Ländern mit niedriger Erkrankungs-Inzidenz, wie zum Beispiel Deutschland, nicht geeignet.

## 1.4 Pathogenese

Der Infektionsvorgang mit MTB erfolgt aerogen durch Inhalation von Bakterien die an kleine Wassertropfen im Exhalat erkrankter Patienten adhärieren. Die primäre Ansteckung mit MTB betrifft ausschließlich die Lunge. Bei intakten immunologischen Abwehrmechanismen des Organismus gegen MTB kommt es zur Ausbildung von charakteristischen Granulomen im Lungenparenchym. Das Auftreten von radiologischen Veränderungen ist deutlich mit dem Immunstatus des Patienten assoziiert (38). Um den Infektionsweg bei einem Tuberkuloseausbruch im Rahmen von Umgebungsuntersuchungen nachvollziehen zu können, gilt der IS6110-DNS-Fingerabdruck als Standardmethode (39). Die Technik erlaubt den Vergleich verschiedener Genotypen geographisch entfernter Regionen (40). Die für ein Bakterium spezifischen DNS-Bandenmuster weisen ein hohes Differenzierungspotential auf. Eine weitere

molekulargenetische Methode zur Untersuchung der Verwandtschaft von Mykobakterienstämmen ist die Spoligotypisierung, die ein etwas geringeres Differenzierungspotential besitzt und in der Regel in Kombination mit der DNA-Fingerabdruck-Methode Verwendung findet .

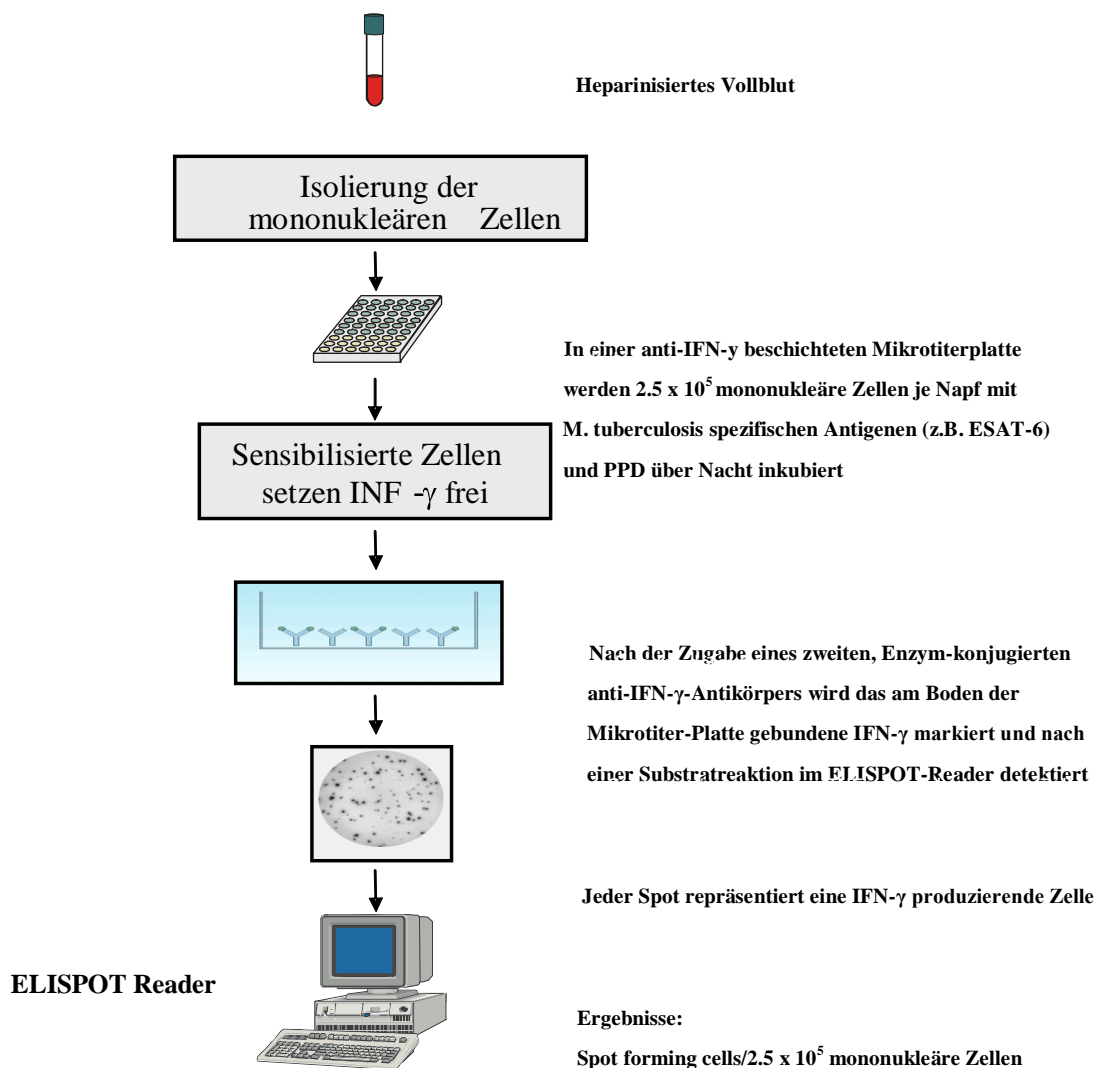
### **1.5 Enzyme linked immunospot (ELISPOT)-Testverfahren**

Neue, auf T-Zell-vermittelter Immunreaktion von Lymphozyten im Blut basierende, Testverfahren zeigen bei der Diagnostik einer Tuberkulose-Infektion beim Menschen viel versprechende Ergebnisse (41-46). Mit der Entdeckung der MTB-spezifischen Antigene Early secreted antigenic target-6 (ESAT-6) und Culture filtrate protein-10 (CFP-10) zur Diagnostik einer MTB-Infektion zeichnet sich ein neues diagnostisches Verfahren ab (47). Ein Zytokin-Testverfahren wurde erstmalig im Jahr 1990 durch Wood et al. zur Diagnostik von boviner Tuberkulose entwickelt (48). Die Technik beruht auf der Messung von im Blut freigesetztem Interferon- $\gamma$  nach Kontakt mit Mykobakterien (42). Das zu Beginn der ELISPOT-Testverfahren verwendete PPD als stimulierendes Antigen wurde etwa ab dem Jahr 2000 durch die beiden Antigene ESAT-6 und CFP-10 ersetzt.

Die ELISPOT-Analysen basieren auf dem Prinzip, dass Effektorzellen, die sich nach Kontakt mit MTB-spezifischen Antigenen differenziert haben, Interferon- $\gamma$  produzieren, wenn diese erneut auf MTB-spezifische Antigene treffen (33).

Die neueren Testverfahren verwenden die MTB-spezifischen Antigene ESAT-6 und CFP-10, deren Einsatz bereits in zahlreichen Studien untersucht werden konnte (33, 41, 44, 49-57). In einer Fallstudie von Arend und Kollegen aus dem Jahr 2000 an 37 Patienten, konnte in einer Testung mit beiden Antigenen beispielsweise eine Sensitivität und Spezifität für die Diagnose der aktiven Lungentuberkulose von 84 bzw. 100 Prozent nachgewiesen werden (53). Beide Peptide sind in der Region RD1 (Region of difference 1) im MTB-Genom codiert und sind mit der Virulenz der Mykobakterien assoziiert (58). Die genaue Funktion von ESAT-6 und CFP-10 *in vivo* ist nicht bekannt. ESAT-6 und CFP-10 werden nicht im Genom des *M. bovis*-BCG-Stammes und auch nicht bei den meisten NTM-Stämmen, mit Ausnahme von *M. kansasii*, *M. marinum* und *M. szulgai* (es gibt Kreuzreaktionen mit *M. leprae*) codiert (59). Daher sind diese Antigene weitgehend spezifisch für MTB (59). Die Antigene können für die Diagnostik jeweils allein und/oder in Kombination verwendet werden. Durch den Nachweis einer Antigen-spezifischen Interferon- $\gamma$ -Produktion durch mononukleäre Zellen lassen sich innerhalb von 24 Stunden

nach Antigenkontakt sowohl im ELISA als auch im ELISPOT MTB-spezifische Zellen als Ausdruck eines schnell aktivierbaren immunologischen Gedächtnis' gegenüber MTB nachweisen. Für den ELISA (z.B. Quantiferon®-TB Gold In-Tube; Cellestis Ltd., Carnegie, Australien) wird Venenblut mit MTB-spezifischen Antigenen sowie eine unstimulierte Kontrolle ohne Antigen inkubiert. Anschließend wird das gesamte Interferon- $\gamma$  im Serum durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 420 nm im Photometer bestimmt. Im ELISPOT (z.B. T-SPOT-TB; Oxford Immunotec, Abingdon, UK) werden einzelne Antigen-spezifische Zellen nachgewiesen (47) (s. **Abb. 1**). Hierzu wird aus peripherem Blut das Blutvolumen bestimmt, in dem sich eine definierte Menge (i.d.R. 250 000) mononukleärer PBMCs befindet. Dieses Blutvolumen wird nachfolgend in die Nöpfchen einer Mikrotiterplatte pipetiert. Am Boden der Mikrotiterplatten befindet sich ein Rasen mit monoklonalen Antikörpern gegen Interferon- $\gamma$ , das dort gebunden wird, wo sich jeweils Antigen-spezifische Zellen befinden, die nach Kontakt mit Antigen IFN- $\gamma$  freisetzen. Durch einen zweiten Antikörper kann gebundenes Interferon- $\gamma$  am Boden der Platten sichtbar gemacht werden. Die Anzahl der Punkte, „spots“, entspricht der Anzahl Antigen-spezifischer Zellen pro z. B. 250 000 mononukleärer Zellen.



**Abb. 1:** *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)-spezifischer ELISPOT an mononukleären Zellen aus heparinisiertem Vollblut.

Bisher gab es keine Evaluierung des ELISPOT-Analyseverfahrens in einem Land mit niedriger Inzidenz unter erwachsenen Kontaktpersonen in Zusammenhang mit einem einzelnen ansteckungsfähigem Tuberkulose-Erkrankten.

## **1.6 Ein Polizeischüler mit ansteckender Lungentuberkulose (Index-Fall)**

An der Polizeidirektion für Aus- und Fortbildung in Eutin, Schleswig-Holstein, erkrankte im September 2003 ein Polizeischüler an einer Lungentuberkulose. Der Patient war zum Zeitpunkt der Infektion 31 Jahre alt und unverheiratet. Er war in Oberschlesien geboren und aufgewachsen und lebte seit 1982 in Deutschland. Dem jungen Mann war bis dahin kein wissenschaftlicher Kontakt zu einem an Tuberkulose erkrankten Menschen bekannt. Im Jahr 1973 wurde bei ihm eine BCG-Impfung durchgeführt. Ein Röntgen-Thorax von 1994 zeigte einen unauffälligen Befund. Gegen Mitte bis Ende September 2003 kam es bei dem Polizeischüler zu einem „Infekt der oberen Atemwege“, anschließend stellten sich zunehmender Husten und Nachtschweiß ein. Ende Oktober bemerkte der Patient ein deutliches Schwächegefühl, er hatte jetzt auch Fieber und der Husten war weiter zunehmend. Eine Therapie mit einem „Breitbandantibiotikum“ zeigte keine Besserung der Symptomatik. Im Dezember 2003 traten erstmals Hämoptysen auf. In einer Röntgen-Thorax-Aufnahme (s. unten) stellte sich ein flächiges Oberlappeninfiltrat rechtsseitig, Kavernen- und Spiegelbildung ebenfalls im rechten Lungenoberfeld und eine Verdichtung im linken Mittelfeld dar. Einen Tag vor Weihnachten 2003 erfolgte die Einweisung in die Medizinische Klinik des Forschungszentrums Borstel. In der Mikroskopie des nach Ziehl-Neelsen gefärbten Sputums zeigte sich ein 5-fach positiver Befund für säurefeste Stäbchen. In der Kultur konnte MTB isoliert werden, der Stamm wies in der Empfindlichkeitstestung Sensitivität gegenüber allen Erstlinienmedikamenten zur Therapie der Tuberkulose auf. Zwei Monate nach Beginn der Therapie waren mikroskopisch immer noch säurefeste Stäbchen im Sputum nachweisbar und die MTB-Kultur fiel weiterhin positiv aus. Der offensichtlich hochinfektiöse Patient hatte etwa vier Monate lang Gelegenheit gehabt, Personen in seinem Umfeld zu infizieren.



**Abb. 2:** Röntgen-Thorax des erkrankten Polizeischülers mit Oberlappeninfiltrat rechts und streifig-nodulärer Verdichtung im linken Mittelfeld

### **1.7 Fragestellung und Zielsetzung**

Die Situation an der Polizeischule (Polizeidirektion für Aus- und Fortbildung) in Eutin war besonders dafür geeignet, Kontaktpersonen eines Patienten mit ansteckender pulmonaler Tuberkulose und definierter Exposition mittels THT und dem neuen MTB-spezifischen ELISPOT an peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) mit dem ESAT-6 Antigen zu untersuchen. Bei dem Vergleich des Hauttests mit dem MTB-spezifischen Bluttest sollte zum einen evaluiert werden, welches der beiden Testverfahren eine bessere Korrelation mit der Exposition zum Index-Patienten aufweist, zum anderen wurde der Einfluss der BCG-Impfung auf den THT bzw. auf den ELISPOT untersucht.

Durch die Situation an der Polizeischule als abgeschlossenen Bereich mit einem infektiösen Index-Fall, sowie durch die Aufteilung der Probanden in Schulklassen und durch einen Stundenplan war es möglich, enge und gelegentliche Kontaktpersonen zu definieren. In Zusammenarbeit mit dem ärztlichen Dienst der Landespolizeischule für Aus- und Fortbildung in Eutin wurde bei allen Kontaktpersonen des erkrankten Polizeischülers ein THT durchgeführt, sowie allen Kontaktpersonen mit positivem THT ein Bluttest zur MTB-spezifischen ELISPOT-Analyse angeboten.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Index-Fall und Kontaktpersonen

An der Polizeidirektion für Aus- und Fortbildung (Polizeischule) in Eutin, Schleswig-Holstein (Polizeischule, s. **Abb. 3**) wurden insgesamt 369 Kontaktpersonen einer Index-Person mit ansteckender Lungentuberkulose untersucht. Die Studienteilnehmer wiesen eine unterschiedliche Exposition zum Index-Patienten auf und waren in den verschiedensten Bereichen der Polizeischule tätig. Außer dem erkrankten Polizeischüler befanden sich 187 weitere Schüler zu dieser Zeit in der Ausbildung. Eine Betriebsärztin war für die medizinischen Belange der Schüler und des Personals zuständig. Die Schüler waren je nach Ausbildungsstand in verschiedene Gruppen aufgeteilt und zwar insgesamt 6 Gruppen im 1. und 5 Gruppen im 2. Ausbildungsjahr.



**Abb. 3:** Luftaufnahme der Polizeidirektion für Aus- und Fortbildung (Polizeischule) Eutin, Schleswig-Holstein (Quelle: Google Earth)

Im Verlauf dieser Studie - im April 2004 - erkrankte ein Ausbilder an einer tuberkulösen Pleuritis. Vor der Untersuchung wurden alle Probanden gemäß ihres Kontaktes und der Dauer des Kontaktes zu dem Index-Fall in enge und gelegentliche Kontaktpersonen

aufgeteilt. Die Ermittlung des Kontaktes bzw. der Nähe der Polizeischüler und der Ausbilder zu dem Index-Fall basierte hauptsächlich auf deren Einteilung in Schulklassen und konnte außerdem mit Hilfe des Stundenplanes nachvollzogen werden.

Zusätzlich wurden von allen Kontaktpersonen mittels eines Fragebogens epidemiologische Daten erhoben (Fragebogen s. Anhang). In dem Fragebogen waren Patientenummer und der ermittelte Indurationsdurchmesser vom Arzt auszufüllen. Fragen zur Person und zur Anamnese waren von dem jeweiligen Probanden auszufüllen. Diese Fragen betrafen unter anderem Alter und Herkunft des Probanden, wobei bei einer Herkunft aus Deutschland in Ost und West unterteilt wurde. Der Hauptanteil der Fragen betraf sowohl Fragen zu anamnestischen Ereignissen wie einer vorangegangenen BCG-Impfung, vorangegangener Hauttestungen mit Angaben zu einer etwaigen Hautreaktion, Fragen nach der Applikationsart des Hauttests (Stempel- oder Injektionstest), als auch die Befragung nach einer bereits durchgemachten Tuberkulose-Erkrankung, eventueller Therapie und der Dauer der Therapie. Es folgten Fragen zu neu aufgetretenen Krankheitssymptomen wie Fieber, Gewichtsverlust, Husten in den vorangegangenen sechs Monaten und nach möglichen Kontakten zu Menschen mit ansteckender Lungentuberkulose. Abschließend wurden die Probanden nach chronischen Infektionskrankheiten, Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus und chronischen Nieren- oder Lebererkrankungen befragt.

Bei allen Probanden wurde gemäß den Empfehlungen des Deutschen Zentral-Komitees zur Bekämpfung der Tuberkulose (DZK) 12 Wochen nach einem möglichen Kontakt zu dem erkrankten Schüler ein THT durchgeführt. Allen Hauttest-positiven Probanden sowie randomisiert Hauttest-negativen Individuen wurde eine Testung mit dem ELISPOT mit dem ESAT-6 Antigen, angeboten.

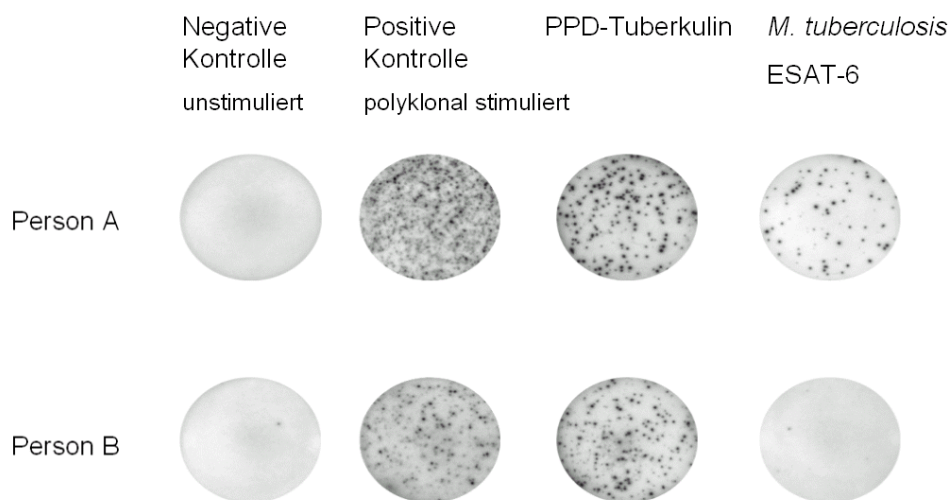
## **2.2 Enzyme linked immunospot (ELISPOT)**

Die ELISPOT-Analysen zur Messung humanen IFN- $\gamma$  wurden gemäß den Angaben des Herstellers (des Testsystems AID, Strassberg, Deutschland) durchgeführt (s. **Abb. 1**). Periphere Blut-mononukleäre Zellen (PBMC) wurden aus Heparinblut der Probanden isoliert und mit Hilfe von Ficoll-Hypaque Dichte-Gradient-Centrifugation von den übrigen Zellen getrennt. Die Zellen wurden in einem RPMI 1640 Medium mit 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu$ g/ml Streptomycin, 2 mmol/l L-Glutamin und 5% FCS-Kultur kultiviert.

Zweihunderttausend PBMCs wurden über Nacht auf 96-Näpfcchen Mikrotiter-Platten, welche mit einem Maus-Anti-Human-Interferon- $\gamma$ -Antikörper präpariert waren, in 200  $\mu$ l

Kultur-Medium inkubiert. Die Zellen wurden für die Negativ-Kontrolle unstimuliert belassen und für die Positiv-Kontrolle entweder mit 10 ng/ml anti-CD3 monoklonalen Antikörpern (clone X35, Beckmann-Coulter, Krefeld, Germany) oder mit 10 µg/ml PPD (purified protein derivate of tuberculin; Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) oder mit 5 µg/ml ESAT-6 Antigen (freundlicherweise von der Firma AID, Strassberg, Deutschland zur Verfügung gestellt) stimuliert. Nachdem die Proben für 20 Stunden bei 37°C kultiviert wurden, sind die Platten gewaschen und für weitere 2,5 Stunden, in Gegenwart eines Maus-Anti-Human-IFN- $\gamma$  monoklonalen Antikörpers, bei Zimmertemperatur inkubiert worden. Die Platten wurden erneut gewaschen und nach 2 Stunden Inkubation mit Streptavidin konjugierter Meerrettich-Peroxidase (HRP) nochmals gewaschen und ein Substrat-Puffer (AEC enthaltend (3-Amino-9-Ethylcarbazole) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugefügt. Die Reaktion wurde nach 20 – 30 Minuten durch Zugabe von entionisiertem Wasser gestoppt. Nach wiederholtem Waschen der Platten mit entionisiertem Wasser wurden diese getrocknet.

Die Darstellung und Analyse der entstehenden Punkte erfolgte durch das AID ELISPOT Reader System ELR02 (AID, Strassberg, Deutschland) (s. **Abb. 2**).



Interferon- $\gamma$  ELISPOT Test mit PBMCs von zwei PPD-positiven Spendern:

Person A: positive IFN- $\gamma$  Spots für ESAT-6: Infektion mit MTB

Person B: negative IFN- $\gamma$  Spots für ESAT-6: keine Infektion mit MTB

**Abb. 2:** Enzyme Linked Immunospot (ELISPOT)-Test mit peripheren Blutmonozyten (PBMCs) von zwei Purified Protein Derivative (PPD)/Tuberkulin Hauttest (THT)-positiven Individuen. (Person A mit Nachweis von Early Secretory Antigenic Target-6 (ESAT-6) spezifischen mononukleären Zellen im Blut).

Der Nachweis von mehr als 5 spots und mindestens doppelt so vielen spots in der stimulierten Kultur im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle gilt als positiver Befund.

### **2.3 Tuberkulin-Hauttest (THT)**

Die Hauttestung erfolgte nach der von Mendel und Mantoux (19, 20) beschriebenen Methode mittels intradermaler Injektion von gereinigtem Tuberkulin GT 10 Behring (Standarddosis: 10 Tuberkulin Einheiten; Chiron-Behring Vaccines, Deutschland), entsprechend 2 TU des Tuberkulin RT 23 des Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark. Der Hauttest wurde an der volaren Seite des Unterarmes durchgeführt und die Hautreaktion frühestens nach 48 Stunden, bevorzugt jedoch nach 72 Stunden, abgelesen. Die Ablesung des Tests erfolgte durch das Ausmessen der Induration in der Querachse des Unterarmes nach der Kugelschreiber-Methode (22). Ein Indurationsdurchmesser von  $\geq 5$  mm galt nach den Empfehlungen des DZK als positives Ergebnis (21). Bei positivem Hauttest wurde eine Röntgen-Thorax-Untersuchung durchgeführt. Sowohl klinische als auch radiologische Befunde wurden dokumentiert. Allen Kontaktpersonen mit einem positiven Hauttest wurde eine neunmonatige Prophylaxe mit Isoniazid (INH) angeboten. Alle beteiligten Kontaktpersonen willigten ein, an der Studie teilzunehmen.

### **2.4 Nachtestung**

Unter den ehemaligen Schülern der Schulklasse ( $n = 14$ ) des Index-Patienten erfolgte nach 24 Monaten eine Nachtestung mit dem MTB-spezifischen ELISPOT.

### **2.5 Statistische Analyse**

Die kategorischen Daten wurden mit dem  $\chi^2$ -Unabhängigkeitstest (Vierfeldertest) analysiert, beziehungsweise mit dem Fisher's Exakt Test bei geringerem Stichprobenumfang, wenn Zellzahlen unter 5 erwartet wurden. Die Übereinstimmung zwischen den THT und ELISPOT Ergebnissen wurde mit dem kappa-Koeffizienten eingeschätzt. Werte unter 0.4 indizierten, falls vorhanden, eine nur geringe Korrelation. Werte von 0.41 – 0.60 zeigten eine gute und Werte über 0.6 eine starke Übereinstimmung (60). Die Daten der unabhängigen Gruppen wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummentest verglichen. Unter der Annahme einer latenten Infektion mit MTB wurde die Nähe bzw. die

Dauer des Kontaktes der Probanden zu dem erkrankten Polizeischüler eingeschätzt. Mit logistischen Regressionsanalysen wurden die Schätzwerte (ORs) der einzelnen Tests im Vergleich zwischen den engen und gelegentlichen Kontaktpersonen beurteilt. Neben der Nähe und Dauer des Kontaktes wurden außerdem die Merkmale Alter, Herkunft (Ost- bzw. West-Deutschland oder Ausland), ELISPOT und THT Ergebnisse sowie der BCG-Impfstatus erfasst.

Alle Tests wurden mit einer 2-seitigen Fragestellung durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

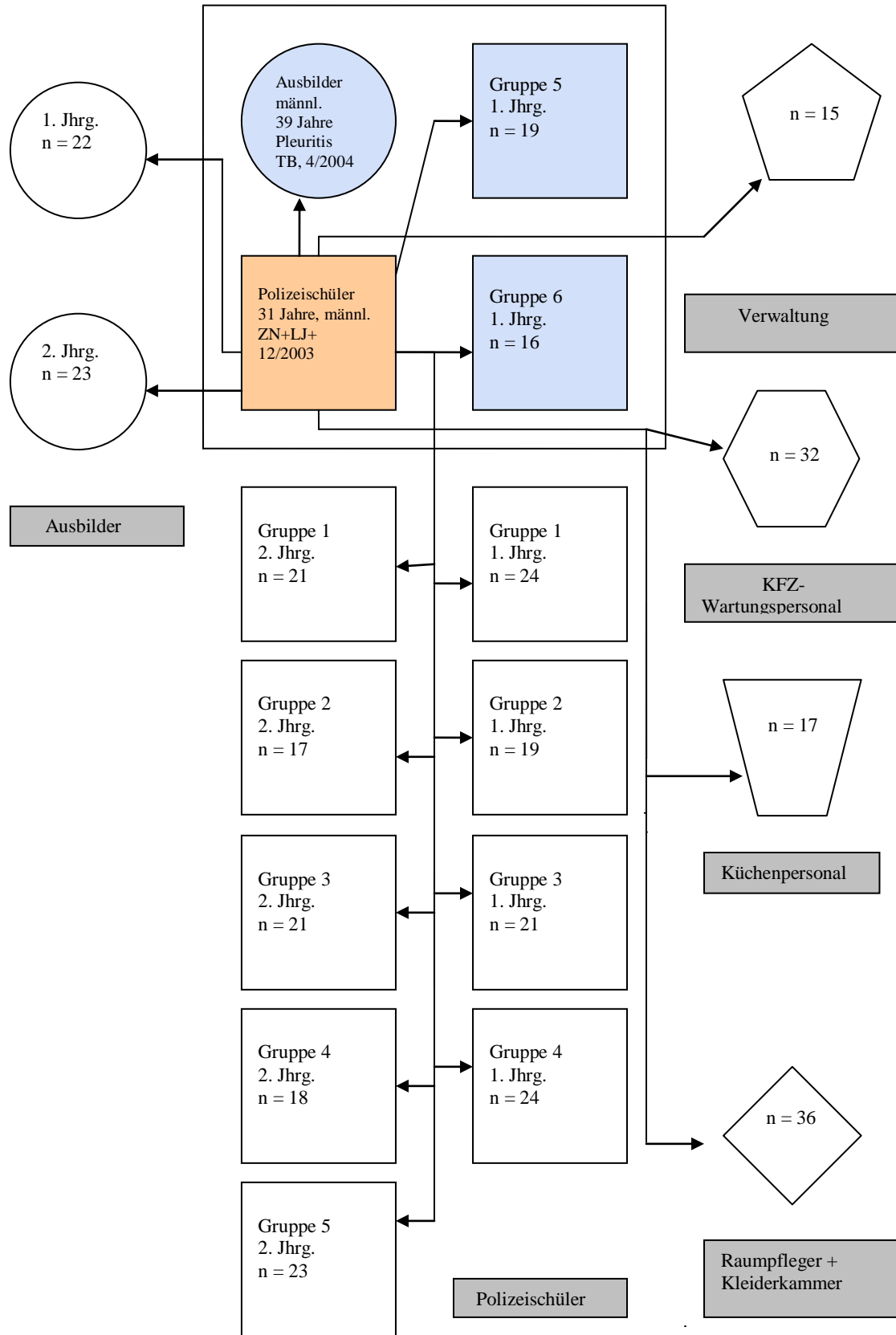
#### 3.1 Exposition der Kontaktpersonen

Alle teilnehmenden Personen wurden gemäß ihres Infektionsrisikos für MTB aufgeteilt in Patienten mit engem und gelegentlichem Kontakt zum Index-Patienten.

Von den 11 bestehenden Ausbildungsgruppen hatte der erkrankte Polizeischüler zu 2 Gruppen seines Jahrganges, zu Gruppe 5 (n = 19) und 6 (n = 16) engen Kontakt. Mit den Schülern dieser beiden Gruppen teilte der Index-Patient den Klassenraum (Gruppe 5) bzw. die Unterkunft (Gruppe 6). Einer der Ausbilder unterrichtete den erkrankten Schüler an einer Demonstrationspuppe in kardiopulmonaler Reanimation und zählte damit ebenfalls zu den engen Kontaktpersonen (insgesamt n = 36). Von diesem im April 2004 an tuberkulöser Pleuritis erkrankten Ausbilder konnte ein Spoligotypisierungsmuster erstellt werden. **Abb. 3** zeigt dieses Muster neben dem Typisierungsmuster des Index-Falles.



**Abb. 3:** Spoligotypisierungsmuster eines *Mycobacterium tuberculosis*-Isolats des Index-Falles und eines Ausbilders an der Polizeischule, der an einer pleuralen Tuberkulose erkrankte.



**Abb. 4:** Verteilung der 369 Kontaktpersonen zu dem infektiösen Polizeischüler  
 ZN: Ziehl-Neelsen; LJ: Löwenstein-Jensen; Hellbraunes Feld: Index-Fall; Blaue Felder:  
 Enge Kontaktpersonen

Zu allen anderen Mitarbeitern der Institution, wie die Ausbilder des 2. Jahrganges, Verwaltung, Küchenpersonal, Reinigungs- sowie KFZ-Wartungspersonal ergaben sich nur gelegentliche Kontakte, welche von kurzer Dauer waren. Betroffen waren neben Polizeischülern, Arbeiter und Angestellte aus allen Bereichen der Schule (s. **Abb. 4**). Das Alter der Personen reichte von 15 – 62 Jahren, mit einem Durchschnittsalter von 28 Jahren, wobei die Mehrzahl männlichen Geschlechts war. Insgesamt wurden 369 Kontaktpersonen mit dem THT nach Mendel-Mantoux untersucht. Es wurden 36 (9.8 Prozent) Personen mit engem und 333 (90.2 Prozent) mit gelegentlichem Kontakt definiert. 158 (42.8 Prozent) der 369 Probanden waren BCG-geimpft, von diesen konnten 37 das Datum der Impfung angeben. Die einzelnen Impftermine lagen zwischen 1963 und 1989, wobei in den Jahren 1983 und 1985 die meisten Impfungen stattfanden. 211 (57.2 Prozent) Individuen hatten nie eine solche Impfung erhalten.

### 3.2 Ergebnisse der Hauttestungen

71 der 369 getesteten Kontaktpersonen wiesen beim Hauttest einen Indurationsdurchmesser von  $\geq 5$  mm auf und präsentierten damit ein positives Ergebnis.

Wie **Tab. 1** zeigt war dies bei 19 der engen Kontaktpersonen und bei 52 derer mit gelegentlichem Kontakt zu dem erkrankten Polizeischüler der Fall. Von den BCG-geimpften Patienten reagierten 44 (27.8 Prozent) im Hauttest positiv, 114 Probanden (72.2 Prozent) zeigten ein negatives Ergebnis.

**Table 1:** Ergebnisse des THT (Tuberkulin-Hauttest) in Abhängigkeit von der Exposition unter engen und gelegentlichen Kontaktpersonen.

|            |                         | THT  |      | Gesamt |
|------------|-------------------------|------|------|--------|
|            |                         | Neg. | Pos. |        |
| Exposition | Enge Kontaktpers.       | 17   | 19   | 36     |
|            | Gelegentl. Kontaktpers. | 281  | 52   | 333    |
| Gesamt     |                         | 298  | 71   | 369    |



Bei den nicht-BCG-geimpften Studienteilnehmern fand sich bei 27 (12.8 Prozent) ein positives Hauttest-Ergebnis, während 184 Personen (87.2 Prozent) hier ein negatives Resultat zeigten (s. **Tab. 2**).

**Table 2:** Ergebnisse des THT (Tuberkulin-Hauttest) in Abhängigkeit des BCG-Impfstatus unter allen teilnehmenden Kontaktpersonen.

|             |      | THT  |      | Gesamt |
|-------------|------|------|------|--------|
|             |      | Neg. | Pos. |        |
| BCG-Impfung | Nein | 184  | 27   | 211    |
|             | Ja   | 114  | 44   | 158    |
| Gesamt      |      | 298  | 71   | 369    |

Unter den Hauttest-positiven Individuen mit BCG-Impfung befanden sich 10 (22.7 Prozent) Probanden mit engem Kontakt und 34 (77.3 Prozent) mit gelegentlichem Kontakt zu dem Index-Fall.

Bei den Ergebnissen der Probanden ohne BCG-Impfanamnese konnte unter den Hauttest-Positiven bei 9 (33.3 Prozent) Personen ein enger Kontakt nachgewiesen werden, bei 18 (66.7 Prozent) ein gelegentlicher Kontakt.

Die Geschlechtsverteilung war in beiden Gruppen, Hauttest-positiv sowie -negativ, gleich, unterschieden sich jedoch von ihrer Herkunft: siebenundzwanzig Prozent (20/74) derer aus dem ehemaligen Ostdeutschland hatten einen positiven Hauttest, aber nur 16 Prozent (46/287,  $p < 0.001$ ) aus dem ehemaligen Westen Deutschlands. 66 (66/74, 89.2 Prozent) der aus Ost-Deutschland stammenden Personen waren BCG-geimpft, während nur 88 der 287 (88/287, 30.6 Prozent) Probanden in West-Deutschland geborenen BCG-geimpft waren ( $p < 0.001$ ).

Die durchschnittliche Größe der Induration betrug 13.8 mm (+/- 6.7 mm) unter den BCG-geimpften, Hauttest-positiven Probanden und 16.2 mm (+/- 8.0mm) unter den ungeimpften Kontaktpersonen, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant.

### 3.3 Testergebnisse ELISPOT

Dreiundachtzig Kontaktpersonen willigten zur Durchführung des ESAT-6-ELISPOT-Tests aus Venenblut ein und zwar 56 der 71 (78.9 Prozent) Hauttest-Positiven Kontaktpersonen und randomisiert 27 der 298 (9.1 Prozent) Hauttest-Negativen (s. **Tab. 3**).

**Tabelle 3:** Ergebnisse der ELISPOT (Enzyme Linked Immunospot)-Testung in Beziehung zum THT bei 56 der insgesamt 71 THT-Positiven, sowie 27 der 298 THT-Negativen.

|        |      | ELISPOT |      | Gesamt |
|--------|------|---------|------|--------|
|        |      | Neg.    | Pos. |        |
| THT    | Neg. | 27      | 0    | 27     |
|        | Pos. | 43      | 13   | 56     |
| Gesamt |      | 70      | 13   | 83     |

**Tabelle 4:** Ergebnisse der ELISPOT (Enzyme Linked Immunospot)-Testung in Abhängigkeit von der Exposition unter insgesamt 83 engen und gelegentl. Kontaktpersonen (56 THT-Pos. u. randomisiert 27 THT-Neg.).

|            |                         | ELISPOT |      | Gesamt |
|------------|-------------------------|---------|------|--------|
|            |                         | Neg.    | Pos. |        |
| Exposition | Enge Kontaktpers.       | 11      | 7    | 19     |
|            | Gelegentl. Kontaktpers. | 59      | 6    | 64     |
| Gesamt     |                         | 70      | 13   | 83     |

Von den 56 THT-positiven Personen zeigten insgesamt nur 13 Probanden (15.6 Prozent) ein positives ELISPOT-Ergebnis. Von den 83 ELISPOT-getesteten Probanden zählten 19 zu den engen und 64 zu den gelegentlichen Kontaktpersonen (s. **Tab. 4**).

Wie **Tab. 5** zeigt, wiesen 47 der mit dem ELISPOT getesteten Probanden eine positive BCG-Impfanamnese auf. Darunter befanden sich 38 der 44 (86.4 Prozent) Hauttest-positiven und 9 der 114 (7.9 Prozent) -negativen Probanden.

**Table 5:** Ergebnisse der ELISPOT (Enzyme Linked Immunospot)-Testung in Abhängigkeit einer BCG-Impfung bei 83 getesteten Kontaktpersonen ( 56 THT-Pos. und randomisiert 27 THT-Neg).

|             |      | ELISPOT |      | Gesamt |
|-------------|------|---------|------|--------|
|             |      | Neg.    | Pos. |        |
| BCG Impfung | Nein | 27      | 9    | 36     |
|             | Ja   | 43      | 4    | 47     |
| Gesamt      |      | 70      | 13   | 83     |

In der Gruppe ohne BCG-Impfung erfolgte bei 18 der 27 (66.7 Prozent) Hauttest-positiven und ebenfalls 18 der 184 (9.8 Prozent) Hauttest-negativen Probanden eine Blutentnahme zur Durchführung der ELISPOT-Analyse. Von den 18 THT-positiven Probanden hatten jeweils die Hälfte engen, beziehungsweise gelegentlichen Kontakt zu dem ansteckenden Polizeischüler. In dieser Gruppe der nicht-geimpften Probanden fanden sich 6 positive ELISPOT-Testergebnisse (6/9, 66.7 Prozent) unter den THT-positiven Personen mit engem Kontakt und 3 positive Test-Ergebnisse (3/9, 33.3 Prozent) bei den Individuen mit gelegentlichem Kontakt zu dem Index-Fall.

### 3.4 Korrelation des THT zum ELISPOT

Unter den THT-negativen Patienten ohne BCG-Impfung ergab sich bezüglich des ELISPOT und des THT eine 100-prozentige Übereinstimmung. Alle 18 THT-negativen Probanden zeigten auch im ELISPOT ein negatives Ergebnis. Betrachtet man die ELISPOT-Ergebnisse der BCG-geimpften Probanden, so gab es jeweils 2 positive

Testergebnisse, sowohl unter den engen (2/10, 20 Prozent) als auch unter den gelegentlichen Kontaktpersonen (2/34, 5.9 Prozent) mit positivem Hauttest. Die 9 THT-negativen Probanden zeigten auch bei den Kontaktpersonen mit BCG-Impfanamnese eine völlige Übereinstimmung mit dem ELISPOT-Ergebnis, nämlich 9 negative Resultate.

Die Übereinstimmung zwischen dem Tuberkulin-Hauttest und dem ELISPOT war in dem gesamten Kollektiv eher niedrig ( $\kappa = 0.16$ ).

Zwischen einer stattgehabten BCG-Impfung und dem ELISPOT-Ergebnis zeigte sich keine Korrelation ( $\kappa = 0.04$ ). Unter den nicht-geimpften Studienteilnehmern war die Übereinstimmung zwischen dem ELISPOT und dem THT gut ( $\kappa = 0.5$ ).

Bezüglich der Indurationsdurchmesser konnte unter den ELISPOT-positiv getesteten Kontaktpersonen im Hauttest ein durchschnittlicher Indurationsdurchmesser von knapp 25 mm (24.8 mm) beobachtet werden, der kleinste Durchmesser betrug 14 mm, der größte 42 mm (bzgl. der Indurationsdurchmesser s. auch **Tab. 6**).

**Tabelle 6:** Ergebnisse des *Mycobacterium tuberculosis*-spezifischen ELISPOT (Enzyme Linked Immunospot)-Test unter THT-(Tuberkulin-Hauttest) positiven Kontaktpersonen;

| BCG    | THT Indurations-<br>durchmesser [mm] | Grad des<br>Kontaktes | Positive THT-<br>Ergebnisse<br>N | ELISPOT-Ergebnisse<br>N |         |   |
|--------|--------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-------------------------|---------|---|
|        |                                      |                       |                                  | Negativ                 | Positiv |   |
| Nein   | 6                                    | Gelegentlich          | 1                                | 1                       |         |   |
|        | 13                                   | Gelegentlich          | 2                                | 2                       |         |   |
|        | 14                                   | Gelegentlich          | 1                                | 1                       |         |   |
|        | 16                                   | Gelegentlich          | 1                                |                         | 1       |   |
|        | 17                                   | Gelegentlich          | 1                                | 1                       |         |   |
|        | 21                                   | Gelegentlich          | 1                                | 1                       |         |   |
|        | 27                                   | Gelegentlich          | 1                                |                         | 1       |   |
|        | 30                                   | Gelegentlich          | 3                                |                         | 3       |   |
|        | Gesamt                               |                       |                                  | 11                      | 6       | 5 |
|        | 10                                   | Eng                   | 3                                | 3                       |         |   |
|        | 15                                   | Eng                   | 1                                |                         | 1       |   |
|        | 22                                   | Eng                   | 3                                |                         | 3       |   |
|        | Gesamt                               |                       |                                  | 7                       | 3       | 4 |
|        | Ja                                   | 7                     | Gelegentlich                     | 1                       | 1       |   |
| 8      |                                      | Gelegentlich          | 3                                | 3                       |         |   |
| 9      |                                      | Gelegentlich          | 1                                | 1                       |         |   |
| 10     |                                      | Gelegentlich          | 5                                | 5                       |         |   |
| 11     |                                      | Gelegentlich          | 4                                | 4                       |         |   |
| 12     |                                      | Gelegentlich          | 1                                | 1                       |         |   |
| 13     |                                      | Gelegentlich          | 1                                | 1                       |         |   |
| 14     |                                      | Gelegentlich          | 1                                |                         | 1       |   |
| 15     |                                      | Gelegentlich          | 3                                | 3                       |         |   |
| 16     |                                      | Gelegentlich          | 1                                | 1                       |         |   |
| 17     |                                      | Gelegentlich          | 1                                | 1                       |         |   |
| 18     |                                      | Gelegentlich          | 2                                | 2                       |         |   |
| 19     |                                      | Gelegentlich          | 1                                | 1                       |         |   |
| 22     |                                      | Gelegentlich          | 1                                | 1                       |         |   |
| 42     |                                      | Gelegentlich          | 1                                |                         | 1       |   |
| Gesamt |                                      |                       | 27                               | 25                      | 2       |   |
| 10     |                                      | Eng                   | 1                                | 1                       |         |   |
| 13     |                                      | Eng                   | 2                                | 2                       |         |   |
| 14     |                                      | Eng                   | 1                                | 1                       |         |   |
| 17     |                                      | Eng                   | 1                                | 1                       |         |   |
| 22     | Eng                                  | 1                     | 1                                |                         |         |   |
| 24     | Eng                                  | 1                     | 1                                |                         |         |   |
| 25     | Eng                                  | 1                     |                                  | 1                       |         |   |
| 27     | Eng                                  | 1                     |                                  | 1                       |         |   |
| Gesamt |                                      |                       | 9                                | 7                       | 2       |   |

BCG: Bacille Calmette-Guérin

### 3.5 Auswertung der Fragebögen

Die Auswertung der Fragebögen ergab bezüglich Vorerkrankungen der Studienteilnehmer insgesamt ein unauffälliges Ergebnis. Bei keinem Proband fand sich ein Anhalt für eine Stoffwechselerkrankung wie Diabetes mellitus oder eine chronische Leber- oder

Nierenerkrankung. Auch für chronische Infektionskrankheiten ergaben sich keine Hinweise. Frühere, wissentliche Kontakte der Probanden zu Personen mit Tuberkulose wurden nicht berichtet. Drei der Probanden waren selbst schon einmal an Tuberkulose erkrankt. Einer von ihnen erkrankte im Jahr 1962 im Alter von 4 Jahren und wurde für 12 Monate antituberkulös behandelt. Der zweite Proband erkrankte im Jahr 1954, ebenfalls im Kleinkindalter und wurde für 8 Monate therapiert. Beide Probanden zeigten ein positives ELISPOT-Ergebnis. Ein dritter Studienteilnehmer, der kein positives ELISPOT-Ergebnis aufwies, erkrankte gleichfalls im Jahr 1954 und wurde nicht antituberkulös behandelt. Bei einer Person bestand anamnestisch einmalig der Verdacht auf eine Infektion mit MTB, welcher sich jedoch nicht bestätigte. Wann dieser Verdacht bestand, ließ sich nicht genau feststellen.

Akute Beschwerden wie Fieber, neu aufgetretener Husten und Gewichtsverlust in den letzten sechs Monaten vor Beginn der Studie, wurden von 24 der 369 Individuen beklagt. 3 dieser Personen, die lediglich neu aufgetretenen Husten angaben, zeigten ein positives ESAT-6 Ergebnis.

Von den 369 Kontaktpersonen stammten 287 (77.8 Prozent) aus dem ehemaligen West-Deutschland, 74 (20.1 Prozent) aus dem früheren Ostdeutschland und 8 (2.2 Prozent) Personen waren im Ausland geboren.

Sechs der 13 ELISPOT-positiv getesteten Probanden (46.2 Prozent) befanden sich in der Ausbildungsklasse des Index-Falles. Unter den weiteren ELISPOT-positiv getesteten Personen war einer der Ausbilder, der später an tuberkulöser Pleuritis erkrankte, eine Person gehörte zur Ausbildungsklasse 6 und wohnte im gleichen Haus wie der Index-Fall. Eine weitere Person hatte früher, länger als 3 Jahre zurückliegend, intensiven Kontakt zu Tuberkulose-Patienten und zwei waren selbst anamnestisch an einer Tuberkulose erkrankt.

### **3.6 Zusammenhang der Testergebnisse mit der Exposition und dem BCG-Impfstatus**

Zur Einschätzung eines möglichen Zusammenhanges zwischen der Intensität des Kontaktes mit den MTB-Bakterien und dem THT-Ergebnis, beziehungsweise dem Ergebnis des ELISPOT-Tests, wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Alle 83 Kontaktpersonen, für die ein ELISPOT-Ergebnis vorlag, wurden in die Untersuchung eingeschlossen. Verglichen mit der Gruppe von Individuen mit gelegentlichem Kontakt zum Index-Fall, war das Risiko eines positiven ELISPOT-Tests 29.2-fach erhöht (95

Prozent Konfidenzintervall (CI), 3.5 - 245.0,  $p = 0.002$ ), und das Risiko eines positiven Hauttests bei einem Indurationsdurchmesser von  $\geq 5$  mm 19.7-fach erhöht (95 Prozent CI, 2.0 - 190.2,  $p = 0.01$ ), wenn ein Individuum engen Kontakt zum Index-Fall hatte (s. **Tab. 7**).

**Tabelle 7:** Relatives Risiko (engl. Odds ratio (OR)) für ein positives THT (Tuberkulin-Hauttest)- Ergebnis mit einem Grenzwert von 5 mm beim Vergleich enger und gelegentlicher Kontaktpersonen.

| Risiko Faktor  | Relatives Risiko (OR) | 95% Konfidenzintervall | <i>P</i>   |
|--|-----------------------|------------------------|------------|
| Stratifikation (enge versus gelegentliche Kontaktpersonen) | 19.7                  | 2.0 – 190.2            | 0.01       |
| Alter  | 0.98                  | 0.95 – 1.0             | 0.9 (n.s.) |
| Herkunft (Ost/West Deutschland)                            | 1.8                   | 0.64 – 5.3             | 0.3 (n.s.) |
| BCG-Impfung  | 4.8                   | 1.3 – 18.0             | 0.02       |

**Tabelle 8:** Relatives Risiko (OR) für ein positives ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target-6) Ergebnis beim Vergleich enger und gelegentlicher Kontaktpersonen.

| Risiko Faktor  | Relatives Risiko (OR) | 95% Konfidenzintervall | <i>P</i>   |
|--|-----------------------|------------------------|------------|
| Stratifikation (enge versus gelegentliche Kontaktpersonen) | 29.2                  | 3.5 – 245.0            | 0.002      |
| Alter  | 1.1                   | 0.99 – 1.2             | 0.6 (n.s.) |
| Herkunft (Ost/West Deutschland)                            | 2.2                   | 0.56 – 8.5             | 0.3 (n.s.) |
| BCG-Impfung  | 0.31                  | 0.05 – 1.9             | 0.2 (n.s.) |

Wie man **Tab. 8** entnehmen kann, liegt das relative Risiko eines positiven ELISPOT mit vorausgegangener BCG-Impfung in dieser Gruppe bei 0.31 (95 Prozent CI 0.05 - 1.9,  $p = 0.2$ ) und ist damit nicht signifikant erhöht.

Legt man für enge Kontaktpersonen einen Grenzwert von 5 mm zugrunde und für gelegentliche Kontaktpersonen von 10 mm, so liegt das Risiko eines positiven Hauttests bei 25.9 (95 Prozent CI 2.8 - 238.1,  $p = 0.004$ ) (s. **Tab. 9**). Wenn anstatt eines Indurationsdurchmessers von  $\geq 5$  mm ein Indurationsdurchmesser von  $\geq 10$  mm gewählt wurde, führte dies zu einem Anstieg des kappa-Wertes auf 0.61 bei den nicht-geimpften Kontaktpersonen und insgesamt auf 0.29. Dadurch wurde eine deutlich bessere Übereinstimmung zwischen den beiden Testverfahren erzielt, als bei einem THT-Grenzwert von  $\geq 5$  mm.

Durch Anheben des Grenzwertes der Induration auf  $\geq 10$  mm fiel der Einfluss der BCG-Impfung auf den Ausgang des Testergebnisses im THT nicht mehr signifikant aus (OR 3.5, 95 Prozent CI 0.98 - 12.8,  $p = 0.054$ ).

**Table 9:** Relatives Risiko (OR) für ein positives THT (Tuberkulin-Hauttest)-Ergebnis bei einem Grenzwert von 5 mm bei engen Kontaktpersonen und einem Grenzwert von 10 mm bei gelegentlichen Kontaktpersonen.

| Risiko Faktor  | Relatives Risiko (OR) | 95% Konfidenzintervall | <i>P</i>    |
|--|-----------------------|------------------------|-------------|
| Stratifikation (enge versus gelegentliche Kontaktpersonen) | 25.9                  | 2.8 – 238.1            | 0.004       |
| Alter  | 0.99                  | 0.95 – 1.1             | 0.89 (n.s.) |
| Herkunft (Ost/West Deutschland)                            | 0.98                  | 0.4 – 2.4              | 0.96 (n.s.) |
| BCG-Impfung  | 3.5                   | 0.98 – 12.8            | 0.02        |

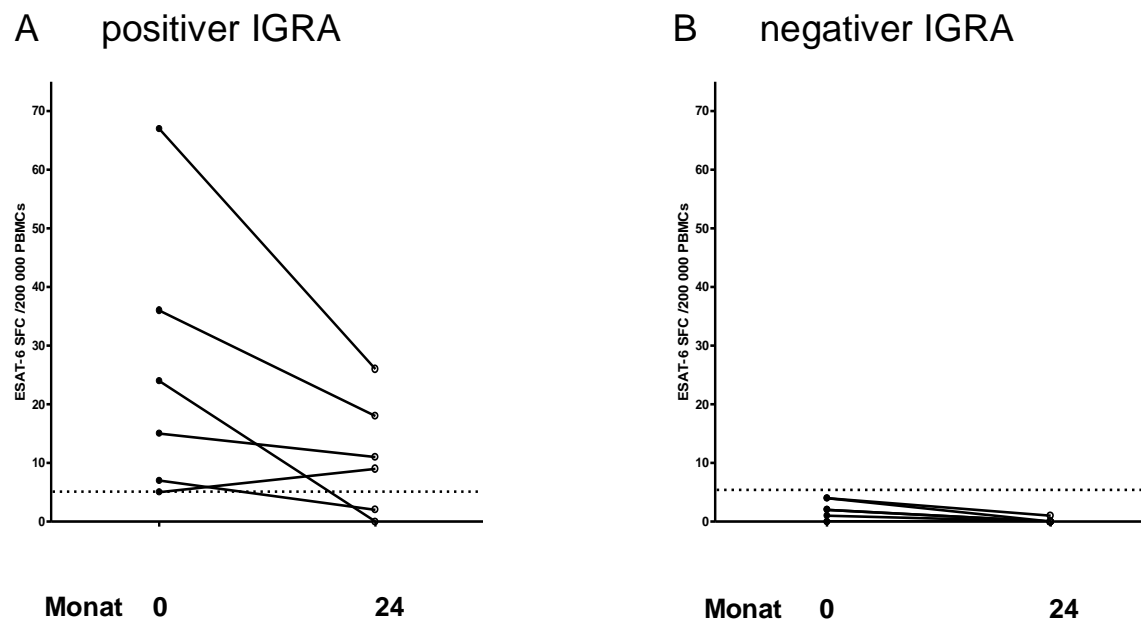
### 3.7 Nachttestung

Die Ergebnisse der Nachttestung (s. **Abb. 5**) zeigten bei allen engen Kontaktpersonen die in der 1. Testung negativ waren, erneut negative Testergebnisse. Die Immunreaktionen der in der 1. Testung positiv getesteten Probanden die zur Nachttestung kamen ( $n = 6/14$ ) lagen in der Nachttestung bei 2/6 Personen jetzt unterhalb des Grenzwerts. Bei den meisten



Kontaktpersonen persistierten die Ergebnisse jedoch oberhalb des Grenzwerts. Allerdings waren die Reaktionen im Trend schwächer. Eine Kontaktperson zeigte allerdings eine Zunahme der Antigen-spezifischen spots. Keiner der getesteten Probanden hatte in der Zwischenzeit eine Therapie erhalten oder eine Tuberkulose entwickelt.

### Verlaufsbeobachtung (0-24 Monate) der MTB-spezifischen Immunreaktionen bei engen Kontaktpersonen



**Abb. 5** : ESAT-6 spezifischer ELISPOT (Interferon- $\gamma$  release assay – IGRA) bei engen Kontaktpersonen des Index-Patienten mit ursprünglich positivem Testergebnis (**A**) oder negativem Testergebnis (**B**) nach 24 Monaten. Keine der Kontaktpersonen erhielt eine Chemoprophylaxe.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde an einer großen Kohorte von erwachsenen Kontaktpersonen eines Patienten mit ansteckungsfähiger Lungentuberkulose der klassische Mendel-Mantoux-Hauttest mit einem neuen ELISPOT-Testverfahren mit dem MTB-spezifischen ESAT-6-Peptid zur Diagnose einer Infektion mit MTB verglichen.

Dies ist die erste Evaluierung des ELISPOT-Analyseverfahrens in einem Land mit niedriger Tuberkulose-Inzidenz unter erwachsenen Kontaktpersonen in Zusammenhang mit einem einzelnen ansteckungsfähigem Tuberkulose-Erkrankten (61).

Ein Testverfahren zur Diagnostik der Infektion mit MTB, das objektive Resultate liefert und dabei unabhängig von Kreuzreaktionen durch NTM oder eine vorangegangene BCG-Impfung ist, wird dringend für die praktische Anwendung benötigt. In dieser Studie sollte untersucht werden, ob ein Interferon- $\gamma$ -Release Assay (IGRA) diese Attribute erfüllt und darüber hinaus eine bessere Korrelation mit dem Grad der Exposition zu MTB aufweist als der THT.

Anhand der Intensität der Exposition zu einer Person mit einer ansteckungsfähigen Lungentuberkulose (gleiche Schulklasse, gemeinsame Unterkunft oder gemeinsame Aktivitäten) wurden die Teilnehmer dieser Studie in enge und gelegentliche Kontaktpersonen eingeteilt. Die Infektiosität von MTB korreliert mit der Dauer der Exposition zu einem Index-Fall (62).

Bei dem Tuberkuloseausbruch in der Polizeidirektion für Aus- und Fortbildung (Polizeischule) Eutin, Schleswig-Holstein wurden 369 Kontaktpersonen untersucht. Von diesen zeigten 71 (19.2 Prozent) einen positiven THT mit einem Indurationsdurchmesser  $\geq 5$  mm. Nach den Richtlinien des DZK musste diesen THT-positiven Kontaktpersonen eine präventive Chemotherapie mit Isoniazid über 9 Monate angeboten werden (21).

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Einleitung einer Therapie auf der Basis eines positiven THT-Ergebnisses mit dem empfohlenen Schwellenwert von  $\geq 5$  mm einer Induration sehr kritisch zu bewerten ist.

In absoluten Zahlen fanden sich in unserer Studie unter den 71 Hauttest-positiven Kontaktpersonen 19 mit engem Kontakt zum Index-Patienten und 52 Personen mit gelegentlichem Kontakt zu dem Index-Fall.

Es befanden sich also mehr Hauttest-Positive unter den Personen mit gelegentlichem Kontakt zum Index-Fall als unter jenen mit engem Kontakt. Von den 71 Hauttest-positiven wiesen 44 eine vorangegangene BCG-Impfung auf, die übrigen 27 Probanden hatten keinen positiven Impfstatus.

Relativ gesehen wiesen mehr als doppelt so viele Hauttest-positive als Hauttest-negative Probanden eine vorangegangene BCG-Impfung auf ( $44/158 = 27.9$  Prozent vs.  $27/210 = 12.8$  Prozent).

Ein falsch-positives Testergebnis aufgrund einer Kreuzreaktion mit *Mycobacterium bovis*-BCG ist hier als ursächlich anzunehmen. Nur 13 von 56 getesteten Kontaktpersonen mit positivem THT hatten in dieser Studie ein positives ELISPOT-Ergebnis, während aus einer Stichprobe von 27 THT-negativen Probanden keiner ein positives ELISPOT-Ergebnis zeigte.

Einer der 13 ELISPOT-positiven Probanden entwickelte im Verlauf der Nachuntersuchungen eine behandlungsbedürftige Tuberkulose.

In Studien über IGRAs, mit ELISPOT oder ELISA durchgeführt, konnte gezeigt werden, dass der IGRA die Spezifität der Diagnose gegenüber dem THT signifikant steigert, da die beiden Antigene ESAT-6 und CFP-10 bezüglich einer Kreuzreaktion durch eine BCG-Impfung oder NTM unbeeinflusst sind (33, 52, 63-65).

Bei den 56 THT-positiven Kontaktpersonen ließ sich im Vergleich zwischen dem THT bei einem Grenzwert von  $\geq 5$  mm Indurationsdurchmesser für Positivität und dem IGRA nur eine schwache Übereinstimmung erkennen ( $\kappa = 0.16$ ). Dagegen war die Übereinstimmung zwischen den beiden Testverfahren bei negativem BCG-Impfstatus mit  $\kappa = 0.5$  gut. Die beobachtete Diskrepanz ließ sich durch falsch-negative ELISPOT-Testergebnisse nicht erklären, zumal die Kontrollgruppe eine optimale Konkordanz zeigte ( $\kappa = 1.0$ ).

Zur Erklärung dieses Resultates gibt es drei Möglichkeiten:

1. Der ELISPOT ist nicht sensitiv genug.
2. Die BCG-Vakzinierung oder eine Infektion mit NTM führt zu falsch-positiven Ergebnissen.
3. Der Grenzwert für ein positives Testergebnis ist mit 5 mm Indurationsdurchmesser zu niedrig angesetzt.

## 1. Ist der MTB-spezifische ELISPOT sensitiv genug, um eine Infektion mit MTB zu diagnostizieren ?

Von den ELISPOT-positiven Probanden in unserer Studie zeigte keiner einen negativen Hauttest.

Von den Personen mit engem Kontakt zum Index-Fall befanden sich insgesamt 7 mit einem positiven ELISPOT. Unter den übrigen Personen mit positivem ELISPOT-Ergebnis war eine Person die früher sehr intensiven Kontakt zu Tuberkulose-Patienten unterhielt, sowie zwei Probanden die anamnestisch an einer Tuberkulose erkrankt waren und behandelt worden sind. Außerdem befanden sich unter den 7 ELISPOT-positiven Probanden einer der im gleichen Haus wohnte, so dass nur 2 Fälle mit positivem ELISPOT-Ergebnis unklar bleiben.

Verglichen mit den Probanden mit gelegentlichem Kontakt zum Index-Fall war das Risiko eines positiven ELISPOT-Ergebnisses unter den Personen mit engem Kontakt zum Index-Fall 29.2-fach erhöht, das Risiko eines positiven THT 19.7-fach erhöht, wobei deutlich wurde, dass das Ergebnis des ELISPOT durch eine vorangegangene BCG-Impfung nicht beeinflusst wird.

Die Ergebnisse des ELISPOT korrelierten besser mit dem Grad der Exposition als die des THT. Dieses Ergebnis war unabhängig von Alter, Geschlecht und BCG-Impfstatus.

Eine Gegenüberstellung des auf RD1-Antigenen basierenden ELISPOT und des THT bei akuter Exposition zu einem infektiösen Index-Fall zeigt auch eine Untersuchung während des bisher größten dokumentierten Tuberkuloseausbruchs in England an einer Schule in Leicestershire im Jahr 2001 (47). Die betreffenden Schüler wurden je nach dem Grad der Intensität des Kontaktes zu dem Index-Fall in 4 Gruppen aufgeteilt. Mit wachsender Exposition zu dem erkrankten Schüler korrelierte der ELISPOT über alle 4 Gruppen signifikant besser als der THT ( $p = 0.03$ ).

Ein isoliertes positives ELISPOT-Ergebnis war hier deutlich stärker mit einer MTB-Exposition assoziiert als ein isoliertes positives THT-Ergebnis (47).

Die Sensitivität des ELISPOT-Testverfahrens mit ESAT-6 und CFP-10 als stimulierende Antigene liegt für die Diagnose der behandlungsbedürftigen Tuberkulose bei 76 – 100 Prozent (49, 53-56, 66-68) (s. **Tab. 10**). Die Kombination der beiden Antigene verbessert die Sensitivität im Vergleich zu der des THT (65-95 Prozent) zusätzlich, wenn auch nur geringfügig (49, 53-56, 66, 68). Für ESAT-6 als allein verwendetes stimulierendes Antigen

bewegen sich die Untersuchungsergebnisse in Populationen mit aktiver Tuberkulose zwischen 32 und 96 Prozent (43, 49, 64, 68-76).

**Table 10:** Sensitivität der Early Secretory Antigenic Target-6 (ESAT-6) und Culture Filtrate Protein-10 (CFP-10) basierten Enzyme Linked Immunospot (ELISPOT)-Testsysteme bei akuter Tuberkulose

| Studie              | ELISA/ELISPOT | TB   | Therapie  | N  | Sensitivität            |
|---------------------|---------------|------|-----------|----|-------------------------|
| Arend et al. 2000   | ELISA         |      | naiv      | 37 | 84 %                    |
| Brock et al. 2001   | ELISA         | p/ep | < 1 Monat | 18 | 78 %                    |
| Brock et al. 2004   | ELISA         | p    | < 7 Tage  | 21 | 86 %                    |
| Munk et al. 2001    | ELISA         |      | naiv      | 41 | p 76 %                  |
|                     |               | p/ep |           |    | ep 86 %                 |
| Ravn et al. 2004    | ELISA         | p    | < 7 Tage  | 48 | 83 %                    |
| Chapman et al. 2002 | ELISPOT       | p    | < 1 Monat | 50 | HIV- 100 %<br>HIV+ 90 % |
| Kang et al. 2005    | ELISPOT       |      | ?         | 54 | 81 %                    |
| Meier et al. 2005   | ELISPOT       |      | ?         | 72 | 97 %                    |
|                     |               | p/ep |           |    |                         |
| Lee et al. 2006     | ELISPOT       | p    | ?         | 87 | 96 %                    |
|                     | ELISA         |      |           |    | 77 %                    |
| Jafari et al. 2006  | ELISPOT       | p    | naiv      | 37 | 100 %                   |

TB = Tuberkulose, p = pulmonale Tuberkulose, ep = extrapulmonale Tuberkulose

Ursächlich für die deutlich differierenden Ergebnisse sind die unterschiedlichen Intensitäten bezüglich der Nähe und Dauer des Kontaktes zu einem ansteckungsfähigen MTB-Patienten. Bei der Identifikation der LTBI liegt die Sensitivität der IGRAs in diversen Untersuchungen zwischen 39 und 85 Prozent, wobei in den meisten Studien (6 von 10 Studien) das ESAT-6 Antigen allein verwendet wurde (41, 47, 64, 66, 70, 72-74, 77, 78) (s. **Tab. 11**)

**Tabelle 11:** Identifikation einer latenten Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* durch Enzyme Linked Immunospot (ELISPOT)-Testsysteme.  
(Kontaktpersonen ohne aktive Tuberkulose)

| Studie               | ELISA/ELISPOT | Antigen        | n   | Test +/n |
|----------------------|---------------|----------------|-----|----------|
| Ravn et al. 1999     | ELISA         | ESAT-6         | 30  | 47 %     |
| Vekemans et al. 2001 | ELISA         | ESAT-6         | 28  | 71 %     |
| Vekemans et al. 2004 | ELISA         | CFP-10         | 44  | 95 %     |
| Arend et al. 2001    | ELISA         | ESAT-6, CFP-10 | 12  | 67 %     |
| Kang et al. 2005     | ELISA         | ESAT-6, CFP-10 | 44  | 76 %     |
| Lalvani et al. 2001  | ELISPOT       | ESAT-6         | 26  | 85 %     |
| Lalvani et al. 2001  | ELISPOT       | ESAT-6         | 50  | 39 %     |
| Pathan et al. 2001   | ELISPOT       | ESAT-6         | 27  | 85 %     |
| Ulrichs et al. 2000  | ELISPOT       | ESAT-6         | 12  | 83 %     |
| Ewer et al. 2003     | ELISPOT       | ESAT-6, CFP-10 | 128 | 88 %     |

Die Unterschiede der Ergebnisse resultieren einerseits aus der unterschiedlichen Exposition der Kontaktpersonen zu einem Index-Fall, außerdem wurden in neueren Studien die beiden RD1-Antigene ESAT-6 und CFP-10 gemeinsam verwendet (47, 66, 77). In einer US-amerikanischen Studie mit 413 Kontaktpersonen befanden sich 209 Personen mit negativem BCG-Impfstatus, die beim Vergleich der beiden Testverfahren THT und ELISPOT eine annähernd identische Sensitivität zeigten. Durch einen sogenannten „Contact-score“ konnte demonstriert werden, dass selbst bei den nicht BCG-geimpften Personen das Ergebnis des ELISPOT eine stärkere Assoziation mit der Exposition zu ansteckungsfähigen Tuberkulosepatienten aufwies, obgleich dieser Unterschied zwischen dem ELISPOT und dem THT statistisch nicht signifikant war (79).

In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass, im Vergleich zum THT, ein positives Ergebnis im ELISPOT stärker mit der Exposition zum Index-Patienten assoziiert war und dass der BCG-Impfstatus auf dieses Ergebnis keinen Einfluss hat.

Ob durch IGRAs eine Voraussage getroffen werden kann, bei welchen Patienten sich aus einer latenten Infektion mit MTB eine behandlungsbedürftige Tuberkulose entwickeln wird, ist bei dem heutigen Stand der Datenlage nicht zu sagen. In einer einzelnen kleinen Studie unter 24 gesunden Kontaktpersonen zu Tuberkulose-Patienten in Äthiopien wurde nach 2 Jahren eine Nachuntersuchung durchgeführt, um dieser Frage nachzugehen. Hier zeigte sich eine deutliche Assoziation zwischen der IFN- $\gamma$ -Immunantwort auf ESAT-6 und

späterer Progression in eine aktive Tuberkulose (80). Die meisten der erkrankten Kontaktpersonen (86 Prozent) reagierten auf ESAT-6, während dies nur 18 Prozent der übrigen Kontaktpersonen taten, die keine aktive Tuberkulose entwickelten (80).

Auch ein rascher Ausschluss einer Infektion bei Patienten mit Verdacht auf eine aktive Tuberkulose ist durch IGRA möglich, wie eine süddeutsche Untersuchung im Jahr 2005 gezeigt hat (67). Bezüglich der Spezifität zeigt das Testsystem auch in anderen Studien aussagekräftige Resultate mit Werten von annähernd 100 Prozent (44, 49, 54-57, 68, 81) (s. **Tab. 12**).

**Tab. 12:** Spezifität der Early Secretory Antigenic Target-6 (ESAT-6) und Culture Filtrate Protein-10 (CFP-10) basierten Enzyme Linked Immunospot (ELISPOT)- Testsysteme bei Personen mit geringem Risiko für eine Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis*.

| Studie                  | ELISA/ELISPOT | TB-Exposition | N   | Spezifität              |
|-------------------------|---------------|---------------|-----|-------------------------|
| Brock et al. 2001       | ELISA         | kein Risiko   | 34  | BCG+ 89 %<br>BCG - 100% |
| Brock et al. 2004       | ELISA         | kein Risiko   | 22  | 100%                    |
| Mori et al. 2004        | ELISA         | kein Risiko   | 213 | 98%                     |
| Munk et al. 2001        | ELISA         | kein Risiko   | 54  | BCG + 94%<br>BCG - 100% |
| van Pinxteren 2000      | ELISA         | kein Risiko   | 14  | 71%                     |
| Ravn et al. 2004        | ELISA         | kein Risiko   | 39  | 83%                     |
| Chapman et al. 2002     | ELISPOT       | kein Risiko   | 40  | 100%                    |
| Scarpellini et al. 2004 | ELISPOT       | kein Risiko   | 32  | 88%                     |

Vergleiche der beiden IGRAs miteinander und mit dem THT gibt es bisher erst wenige. Bei einer simultanen Testung von Patienten mit dem T-SPOT.TB (ELISPOT, Oxford Immunotec, Abingdon, UK), dem QuantiFERON-TB Gold (ELISA, Cellestis Ltd., Carnegie, Australien) und dem THT wurden die beiden Bluttests separat mit dem THT verglichen. Beide IGRAs identifizierten, unter Verwendung der beiden stimulierenden Antigene ESAT-6 und CFP-10, im Vergleich zum THT weniger BCG-geimpfte Individuen als positiv (82).

Unklare Ergebnisse (d.h. hier war die Positiv-Kontrolle nicht positiv, bzw. die Negativ-Kontrolle nicht negativ) traten signifikant häufiger mit dem QuantiFERON-TB Gold auf und wurden bei beiden Testverfahren mit Immunsuppression der Patienten assoziiert (82).

Beim QuantiFERON-TB Gold wurden im Vergleich zum T-SPOT.TB zudem bei der Testung von Kindern unter 5 Jahren signifikant häufiger unklare Ergebnisse beobachtet (82).

Insgesamt zeigten sich im Vergleich zum QuantiFERON-TB Gold mit dem T-SPOT.TB signifikant häufiger positive Ergebnisse. Dies traf auch auf enge Kontaktpersonen von Patienten mit ansteckungsfähiger Tuberkulose zu, hier fanden sich häufiger positive Ergebnisse beim T-SPOT.TB als beim QuantiFERON-TB Gold (82).

In einer südkoreanischen Studie (83) wurden die Ergebnisse der IGRAs und des THT von 87 an aktiver Tuberkulose erkrankter Individuen von insgesamt 218 Patienten verglichen. Einige der Patienten waren immunsupprimiert, außerdem nahm eine Kontrollgruppe mit geringer Wahrscheinlichkeit für eine LTBI teil. Bei einem Grenzwert von 10 mm zeigte der THT in der Gruppe der aktiv erkrankten Patienten eine Sensitivität von 72 Prozent.

Im Vergleich dazu lag die Sensitivität des T-SPOT.TB bei 96 Prozent und die des QuantiFERON-TB Gold Test bei 77 Prozent. Bei den Ergebnissen der immunsupprimierten Patienten zeigte der T-SPOT.TB eine Sensitivität von 100 Prozent und war damit dem QuantiFERON-TB Gold (75 Prozent) deutlich überlegen (83). Die Sensitivität des THT bei immunsupprimierten Patienten betrug in dieser Studie nur 37 Prozent. Bezüglich der Spezifität lagen die Werte der beiden Bluttests über dem des THT, wobei die Spezifität des QuantiFERON-TB Gold zwar höher war als die des T-SPOT.TB, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (83).

## **2. Führt eine Infektion mit NTM oder eine BCG-Vakzinierung zu falsch-positiven THT-Ergebnissen ?**

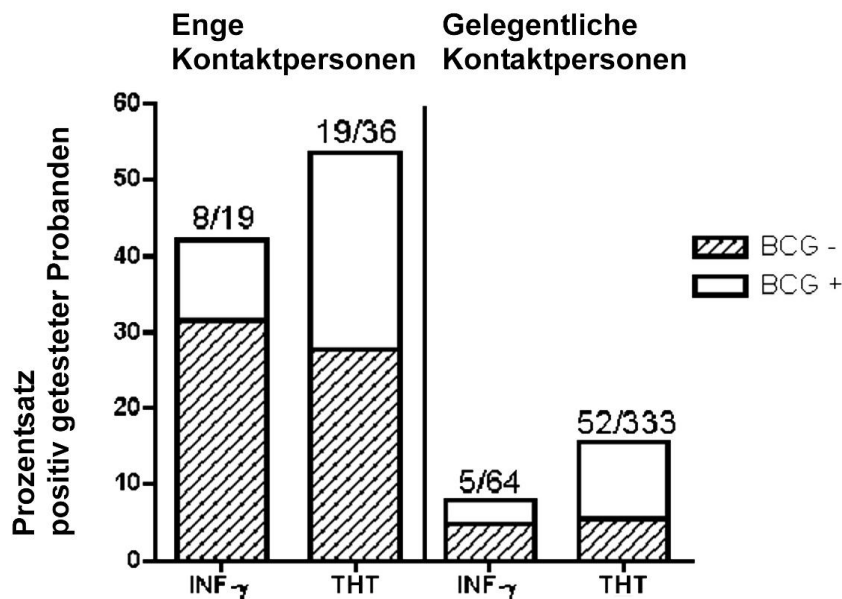
Unter den teilnehmenden Probanden unserer Studie hatten 42.8 Prozent eine vorangegangene BCG-Impfung und damit einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf den THT.

Eine BCG-Impfung oder eine Infektion mit NTM können beim THT zu falsch-positiven Ergebnissen führen (29, 31, 84, 85). Die Kenntnis des BCG-Impfstatus hat zur Beurteilung der Testergebnisse einen hohen Stellenwert, da im BCG-Impfstoff PPD-Antigene enthalten sind, die auch im THT, nicht aber beim ELISPOT verwendet wurden. Die IGRAs der ersten Generation, die PPD als stimulierendes Antigen verwenden, zeigen in Bezug auf Kreuzreaktionen die gleichen Limitationen wie der THT (77). Der Einfluss



der BCG-Impfung auf den THT ist sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern mehrfach unabhängig beobachtet worden (31-33, 36, 47, 86).

In unserer Studie befanden sich mehr THT-positive Personen unter den gelegentlichen Kontaktpersonen als unter den engen, von denen mehr als doppelt so viele einen positiven Impfstatus aufwiesen. Unter den engen Kontaktpersonen zeigte ein Vergleich der THT- und ELISPOT-positiven Ergebnisse mit einem jeweils positivem BCG-Impfstatus anschaulich den deutlich höheren Anteil an BCG-geimpften Individuen unter den THT-positiven Probanden (s. **Abb. 6**).



**Abb. 6:** Anteil positiv getesteter Probanden unter allen teilnehmenden engen sowie gelegentlichen Kontaktpersonen unter Berücksichtigung des BCG-Impfstatus.

Eine Multicenter-Studie von Mazurek und Kollegen mit 1228 Erwachsenen, die sowohl mit dem THT als auch mit dem IGRA (hier ELISA) getestet wurden, zeigte zwar eine Übereinstimmung der beiden Testverfahren von 83 Prozent, jedoch war die Wahrscheinlichkeit für ein diskordantes Ergebnis mit einem positiven THT- und einem negativen ELISPOT-Ergebnis bei Probanden mit bekannter BCG-Impfung im Vergleich zu den ungeimpften Probanden 7-fach höher (87). Ähnliche Ergebnisse, wenn auch in kleinerem Rahmen, zeigen diverse andere Studien (47, 66, 70, 86, 88).

In einer Untersuchung des Effektes der BCG-Impfung auf die Tuberkulin-Reaktion wurde beschrieben, dass nur 8 Prozent der Personen, die zum Zeitpunkt ihrer Geburt eine BCG-Impfung erhielten, 15 Jahre später noch einen positiven THT aufwiesen (18).

In vielen Ländern, größtenteils Gebiete mit hoher Tuberkulose-Inzidenz, finden jedoch Mehrfach-Impfungen statt, so dass von langanhaltenden, dauerhaften Hautreaktionen auszugehen ist. Ein Beispiel hierfür sind auch Probanden in dieser Studie, von denen die meisten aus dem früheren Ost-Deutschland stammten. Hier war es üblich, nach der BCG-Impfung zur Geburt diese, bei Re-Konversion in einen negativen THT, im frühen Jugendalter zu wiederholen.

Ob und mit welcher Intensität eine BCG-Impfung das Ergebnis eines THT beeinflusst, hängt davon ab, wie lange die letzte Impfung zurückliegt, wie viele Impfungen stattfanden und mit welchem BCG-Stamm geimpft wurde (84). Oftmals liegen über die einzelnen Parameter leider keine genauen Informationen vor und der Impfstatus bleibt unklar.

Nur bei BCG-ungeimpften Probanden war die Übereinstimmung zwischen dem Tuberkulin-Hauttest und dem ELISPOT in unserer Studie gut ( $\kappa = 0.5$ ) und es konnte gezeigt werden, dass der THT im Vergleich zum MTB-spezifischen ELISPOT deutlich durch eine vorangegangene BCG-Impfung verfälscht wird [OR 4.8 (95 Prozent CI, 1.3 - 18.0,  $p = 0.02$ )].

Vergleichbare Ergebnisse finden sich neuerdings auch in anderen Arbeiten (44, 66).

Als Fazit aus diesen Ergebnissen sollte eine Therapieindikation bei einem Probanden mit vorangegangener BCG-Impfung nur aufgrund eines positiven IGRA gestellt werden (89).

Auffallend in dieser Studie war, dass unter den ELISPOT-positiven Probanden der Anteil der BCG-geimpften Personen geringer war als unter den ungeimpften Studienteilnehmern. Diese Abweichung könnte möglicherweise Ausdruck eines protektiven Effektes der BCG-Impfung vor einer MTB-Infektion darstellen. In einer Studie zur Untersuchung von Risikofaktoren für eine MTB-Infektion mit 979 Kindern, von denen 79 Prozent eine BCG-Impfung aufwiesen, wurde tatsächlich ein protektiver Effekt der BCG-Impfung nicht nur gegen eine akute Tuberkulose-Erkrankung, sondern auch gegen eine Infektion mit MTB beobachtet (90). Allerdings wird der Effekt aufgrund einer fraglich unklaren Exposition gegenüber MTB, auch vor dem Hintergrund sozioökonomischer Unterschiede in den Kollektiven, angezweifelt (91).

Es sind sicherlich noch longitudinale Studien zur Klärung dieser Frage notwendig.

Eine Infektion mit NTM und dadurch verursachter Kreuzreaktionen könnte eine weitere Erklärung für die beobachtete Diskrepanz zwischen den ELISPOT-Ergebnissen und den THT-positiven Ergebnissen in unserer Studie sein. Achtundfünfzig der 71 THT-positiven Probanden zeigten ein negatives ELISPOT-Ergebnis (82 Prozent).

Die Reaktion des THT auf NTM beruht, ähnlich wie bei der BCG-Impfung, auf dem Vorhandensein von Antigenen des Tuberkulins, welche auch bei verschiedenen NTM präsent sind. Die RD1-Antigene werden, mit Ausnahme von *M. kansasii*, *M. marinum* und *M. szulgai*, von den meisten NTM nicht exprimiert (33). Allerdings wurde ein ESAT-6 homologes Antigen im Genom von *M. leprae* identifiziert (92).

Für eine Infektion mit NTM sind bestimmte Personengruppen beruflich oder aufgrund ihres Hobbys prädestiniert, beispielsweise Veterinäre, Blumen- und Gemüsezüchter. Bei den Probanden in dieser Studie gab es keinen Anhalt für eine Infektion mit NTM.

Laut Literaturangaben können etwa ein Fünftel der positiven THT-Ergebnisse bei BCG-ungeimpften Probanden mit negativem IGRA durch eine Infektion mit NTM bedingt sein (87).

### **3. Ist der Grenzwert einer Induration von $\geq 5$ mm beim THT zur Diagnose einer LTBI zu niedrig angesetzt ?**

Die Abweichung zwischen den Ergebnissen des ELISPOT-Tests und des THT war bei einem Grenzwert von  $\geq 5$  mm groß und erklärte sich möglicherweise durch falsch-positive THT-Ergebnisse nach einer BCG-Impfung. Von den 19 engen Kontaktpersonen mit positivem THT wiesen 10 Probanden eine vorangegangene BCG-Impfung auf. Insgesamt standen den 71 THT-positiven Ergebnissen (sowohl von engen als auch gelegentlichen Kontaktpersonen) 58 (82 Prozent) negative ELISPOT-Ergebnisse gegenüber. Durch Anheben des Grenzwerts für Positivität von  $\geq 5$  mm auf  $\geq 10$  mm verbesserte sich die Übereinstimmung zwischen den beiden Testverfahren deutlich und steigerte den  $\kappa$ -Wert auf 0.29 insgesamt und bei den nicht-geimpften Kontaktpersonen sogar auf 0.6. Dieses Ergebnis bekräftigte die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver THT-Ergebnisse durch einen positiven BCG-Impfstatus. Der Einfluss der BCG-Impfung in unserer Studie wirkte sich nach Anhebung des Grenzwerts für Positivität auf den Ausgang des Testergebnisses des THT nicht mehr signifikant aus. Diese Korrelation bei einem Grenzwert von  $\geq 10$  mm lässt sich auch bei anderen Untersuchungen beobachten (61, 93).

Die Grenzwerte, ab denen ein Tuberkulin-Hauttest als positiv anzusehen ist, sind, entsprechend den Ergebnissen großer Studien, uneinheitlich festgelegt worden (30). Ein Grenzwert von  $\geq 10$  mm wird gemäß den aktuellen Richtlinien bei Personen mit erhöhtem Risiko für eine Infektion mit MTB, wie beispielsweise Immigranten aus Ländern mit hoher Tuberkulose-Prävalenz, empfohlen (21).

Im Jahr 1995 wurden erstmals in den USA drei unterschiedliche Indurationsdurchmesser definiert. Diese Empfehlungen der ATS (American Thoracic Society) und CDC (Centers for Disease Control and Prevention) finden auch in Deutschland Anwendung. Somit liegt die Indurationsgrenze für Personen mit kürzlichem Tuberkulosekontakt in den Vereinigten Staaten ebenfalls bei  $\geq 5$  mm (29, 94). Die meisten europäischen Länder schlossen sich dieser Regelung an. Bei den schweizerischen Kriterien für Tuberkulinpositivität liegt der Grenzwert für einen positiven THT bei  $\geq 10$  mm (95, 96).

Besonders bei nicht-geimpften Personen mit gelegentlichem Kontakt zu einem Index-Fall führt ein Grenzwert von  $\geq 10$  mm zu einer deutlich besseren Übereinstimmung zwischen dem THT und dem ELISPOT im Vergleich zu einem Grenzwert von  $\geq 5$  mm. Dies bezieht sich sowohl auf die Beeinflussung des Testergebnisses durch eine vorangegangene BCG-Impfung, als auch auf die Korrelation der Dauer der Exposition zu einem Index-Fall (77, 86, 93).

Die Untersuchung der drei o.g. Punkte bezüglich der Diskrepanz zwischen den Untersuchungsergebnissen unserer Studie hat verdeutlicht, dass ein Anheben des Grenzwerts von  $\geq 5$  mm auf  $\geq 10$  mm bei BCG-geimpften und gelegentlichen Kontaktpersonen die Anzahl der falsch-positiven THT-Ergebnisse reduziert und die Korrelation der beiden Testverfahren deutlich verbessert. Außerdem zeigt die sehr gute Übereinstimmung zwischen den Testergebnissen bei den ungeimpften, gelegentlichen Kontaktpersonen die Korrelation mit der Exposition gegenüber MTB.

Das bedeutet im Vergleich zum THT eine bessere Spezifität bei BCG-geimpften Kontaktpersonen und eine stärkere Assoziation mit der Exposition zu einer Index-Person.

Als Konsequenz daraus sollte bei Patienten mit vorangegangener BCG-Impfung oder unklarem Impfstatus sowie bei gelegentlichen Kontaktpersonen ein Grenzwert von  $\geq 10$  mm Indurationsdurchmesser für Positivität zugrunde gelegt werden und vor Einleitung einer Chemotherapie eine zusätzliche Testung mit einem auf RD1-Antigenen basierenden IGRA erfolgen.

Diese Empfehlung wird auch von der Lungenliga der Schweiz im Handbuch Tuberkulose gegeben (97). In den Niederlanden wird aufgrund der bekannten Kreuzreaktivität der Tuberkulin-Hauttest bei BCG-geimpften Personen nicht durchgeführt (77). Eine Chemotherapie und radiologische Untersuchungen auf der Grundlage eines falsch-positiven THT führen zu unnötiger Strahlenbelastung bzw. systemisch-toxischer Belastung des Patienten.

Die Sensitivität des THT kann bei Individuen mit abgeschwächter Immunabwehr erniedrigt sein (31, 33). Risikofaktoren für einen falsch-negativen THT bei Immunsuppression unterliegen dem Einfluss der individuellen Immunkompetenz und sind entsprechend variabel. Eine herabgesetzte Immunkompetenz, hervorgerufen durch T-Zelldefekte wie z.B. bei einer HIV-Infektion, einer lymphatischen Systemerkrankung oder einer iatrogenen Immunsuppression wie etwa bei anti-TNF- $\alpha$ -Therapie, kann zu falsch-negativen THT-Ergebnissen führen (98, 99).

Neben o.g. Risiken können aber auch eine fulminante tuberkulöse Erkrankung, Untergewicht, hohes Lebensalter, Kleinkindalter, akute oder kurz zurückliegende schwere Virusinfektionen, Sarkoidose, Krebserkrankungen sowie ein Zeitraum von 6 Wochen nach Lebendimpfungen und kurz zurückliegende (< 2 Monaten) tuberkulöse Infektionen falsch-negative THT-Ergebnisse verursachen (23).

In Bezug auf die Sensitivität des ELISPOT wurde der Effekt einer abgeschwächten Immunkompetenz am Beispiel einer HIV-Infektion von Chapman und Kollegen untersucht (55). Sie konnten zeigen, dass das ELISPOT-Testverfahren, unter Verwendung der beiden Antigene ESAT-6 und CFP-10, eine Sensitivität von 100 Prozent bei HIV-negativen Patienten und von 90 Prozent bei HIV-positiven Patienten aufweist.

Bei einem Vergleich des ELISPOT mit dem THT zur Diagnose einer LTBI bei immunsupprimierten Patienten mit hämatologisch/onkologischen Krankheitsbildern nach Kontakt zu einem infektiösen Index-Fall hat sich gezeigt, dass der ELISPOT von dem Grad der Immunsuppression unbeeinflusst ist, während beim THT die Prävalenz einer Infektion mit ansteigender Immunsuppression von 25.9 auf 14.5 Prozent sank (100).

In Einzelfällen können bei immunsupprimierten Patienten mit negativem THT positive ELISPOT-Ergebnisse Therapie entscheidend sein (101).

Besonders vor Einleitung einer Therapie mit anti-TNF- $\alpha$ -Antikörpern (z.B. Infliximab) muss eine LTBI abgeklärt und im Zweifelsfall eine präventive Behandlung veranlasst werden, da die Reaktivierung einer MTB-Infektion zu den am meisten gefürchteten, unerwünschten Wirkungen dieser Form der iatrogenen Immunsuppression zählt (102-104).

Die Sensitivität des MTB-spezifischen ELISPOT ist bei immunsupprimierten Patienten jedoch noch nicht ausreichend untersucht und die aktuelle Datenlage erlaubt derzeit keine zuverlässige Empfehlung.

Bei der Diagnostik der extrapulmonalen Tuberkulose zeigen neuere Studien, dass der MTB-spezifische ELISPOT aussagekräftige Testergebnisse liefert:

Mit einem MTB-spezifischen ELISPOT unter Verwendung des ESAT-6-Antigens konnte in der Pleuraflüssigkeit von Patienten mit kulturell gesicherter tuberkulöser Pleuritis eine hohe Konzentration an ESAT-6 spezifischen IFN- $\gamma$ -produzierenden T-Zellen nachgewiesen werden (105). *Mycobacterium tuberculosis*-spezifische Zellen aus dem Pleuraerguss erkannten ein breiteres Spektrum an MTB-spezifischen Peptiden des ESAT-6 Antigens als die T-Zellen aus dem peripherem Blut. *Mycobacterium tuberculosis*-spezifische Zellen fanden sich nicht im Pleuraerguss bei 7 von 8 Kontrollpatienten mit nicht-tuberkulösen pleuralen Erkrankungen (105).

In einer aktuellen Studie wurde der MTB-spezifische ELISPOT zur Diagnose der mikroskopisch negativen Lungentuberkulose untersucht. Dabei konnte durch Nachweis MTB-spezifischer Zellen aus der bronchoalveolären Lavage (BAL) die Diagnose einer Tuberkulose gestellt werden (106). In einer Kohorte von 37 Patienten (12 Patienten mit pulmonaler Tuberkulose und 25 Kontrollpatienten) zeigte der MTB-spezifische ELISPOT mit den Antigenen ESAT-6 und CFP-10 bei einem Grenzwert von 5 Antigen-spezifischen Zellen/200000 mononukleären Zellen aus der BAL (BALMCs) eine Sensitivität und Spezifität von 100 Prozent und lag damit deutlich über der Sensitivität und Spezifität einer DNA-Amplifikation mit Sputum oder BAL.

Was die Verwendung der IGRAs zur Beobachtung von Krankheitsverläufen unter Chemotherapie betrifft, so konnten Pathan und Kollegen zeigen, dass die Anzahl von ESAT-6 spezifischen IFN- $\gamma$  sezernierenden CD4-T-Zellen während einer antituberkulösen Therapie fällt. Wahrscheinlich verhält sich die Anzahl von ESAT-6 spezifischen T-Zellen relativ zur Bakterien-Last (64).

In anderen Untersuchungen wurde dagegen unter antituberkulöser Therapie eine Zunahme der IFN- $\gamma$ -Immunreaktion gegen ESAT-6 beobachtet (74, 107, 108). Ravn und Kollegen konnten über einen Beobachtungszeitraum von 6 Monaten keinen Unterschied in der Reaktion auf einen ESAT-6 basierenden ELISA unter Chemotherapie nachweisen (72).

Um den Stellenwert der IGRAs zum Monitoring von Krankheitsverläufen unter und nach Chemotherapie zu beurteilen, sind längerfristige Studien notwendig.

## 4.1 Nachtestung

In der hier vorliegenden Arbeit wurde bei den engen Kontaktpersonen der Schulklasse des Index-Patienten nach 24 Monaten erneut ein MTB-spezifischer ELISPOT mit dem ESAT-6 Antigen an mononukleären Zellen des Blutes durchgeführt. Alle Kontaktpersonen hatten auf eine Chemoprophylaxe verzichtet. Bei 5/7 Personen, die initial ein positives Testergebnis hatten, fiel das Testergebnis erneut positiv aus. Tendenziell nahm die Anzahl Antigen-spezifischer T-Zellen jedoch ab. Bei den Kontaktpersonen, bei denen das Testergebnis initial negativ ausgefallen war, blieb das Testergebnis auch in der Nachtestung negativ.

Erst Verlaufsbeobachtungen werden zeigen, ob und gegebenenfalls wie lange die ELISPOT-Reaktionen in gesunden Kontaktpersonen nachweisbar sind. Es ist anzunehmen, dass ein persistierend positives Testergebnis tatsächlich Ausdruck einer persistierenden latenten Infektion mit *M. tuberculosis* darstellt. Unter dieser Annahme könnte das Risiko der Entwicklung einer aktiven Tuberkulose bei den persistierend IGRA-positiven Personen gegenüber den THT-positiven Personen deutlich erhöht sein. Unter Umständen beträgt dann das Risiko ein Vielfaches der oft beschriebenen 5 – 10 Prozent für die Entwicklung einer aktiven Tuberkulose (5, 6), da die Spezifität der IGRAs deutlich höher ist, als die des THT. Zur Klärung dieser Fragestellung sind langfristige Verlaufsbeobachtungen an großen Kohorten von engen Kontaktpersonen ansteckungsfähiger Index-Patienten notwendig.

## 4.2 Kosteneffizienz des ELISPOT im Vergleich zum THT

Bei der Darstellung der Kosten scheint der ELISPOT im Vergleich zum THT aufgrund des deutlich höheren Preises auf den ersten Blick benachteiligt zu sein. (s. **Tab. 13**).

Der THT ist kostengünstig und benötigt nur einen minimalen Laboraufwand. Allerdings müssen die Patienten zur Ablesung des Testergebnisses ein zweites Mal gesehen werden, was sowohl für den Arzt als auch für den Patienten gleichermaßen aufwendig ist.

Zu den tatsächlichen Kosten des THT zählen jedoch vor allem jene, welche aufgrund falsch-positiver Testergebnisse entstehen. Dies sind neben Kosten für radiologische Diagnostik und Laboruntersuchungen, vor allem Kosten für überflüssige Chemotherapien und Krankenhausaufenthalte.

**Table 13:** Preisvergleich zwischen THT (Tuberkulin-Hauttest) und ELISPOT (Enzyme Linked Immunospot) Test

| Test   | THT   | ELISPOT   |
|--|---|---|
| Warenzeichen                                 | Tuberkulin<br>PPD RT 23 SSI                 | T-SPOT. <i>TB</i>   |
| Packungsgröße                                | 1 x 10 x 1,5ml<br>Vial                      | TB-SPOT. <i>TB</i> 8<br>12 Streifen à 8<br>Näpfchen   |
| Anzahl Patienten, die getestet werden können | Pro 1,5 ml Vial<br>ca. 10 – 12<br>Patienten | Pro Streifen 2 Patienten  |
| Preis (netto)                                | 129,30 €                                    | 1080,00 €   |
| Haltbarkeit                                  | Ein Vial ist<br>nach Anbruch<br>24h haltbar | Ein verpackter Streifen<br>ist 3 Mon. haltbar;<br>Haltbarkeiten werden<br>durch Echtzeitstudien<br>weiter verlängert; |

In einer Schweizer Studie zur Kosteneffektivität stellte sich eine Testung mit dem THT und Verifizierung der positiven Testergebnisse durch einen IGRA (hier: T-SPOT.*TB*) als kostengünstigste Variante heraus (109).

Die Anzahl der Patienten, die eine präventive Chemotherapie erhalten, kann so reduziert werden. Ein ähnliches Ergebnis konnte in einer Untersuchung in Deutschland (110) gezeigt werden. Hier führte eine Kombination des THT mit dem QuantiFERON-TB Gold In-Tube im Vergleich zur Testung mit dem THT allein zu einer deutlichen Reduktion der Kosten für die Umgebungsuntersuchungen bei engen Kontaktpersonen um 43 Prozent.

Die IGRAs wurden in zwei verschiedenen Formaten entwickelt, basierend auf ELISA (QuantiFERON-TB Gold In-Tube; Cellestis Limited, Carnegie, Australia) oder ELISPOT (T-SPOT.*TB*; Oxford Immunotec, Abingdon, UK) sind sie aktuell kommerziell erhältlich. In Bezug auf die Kosten der beiden verschiedenen Testmethoden scheint sich die Kombination des THT mit einem IGRA als kosteneffizienteste Variante durchzusetzen (109, 110).



### 4.3 Offene Fragen

Um die Einsatzfähigkeit der IGRAs weiter zu evaluieren, sind zusätzliche Untersuchungen notwendig. Hierzu gehören:

1. Studien in Hoch-Endemie Ländern für die Tuberkulose mit einer hohen Rate an Personen mit LTBI und positivem BCG-Impfstatus.
2. Studien bei Risikopatienten, z.B. bei HIV-Infizierten und Patienten mit anderen Immun-Defekten bzw. bei immunsupprimierten Patienten, bei untergewichtigen Patienten, bei Patienten mit hohem Lebensalter und bei Kleinkindern.
3. Studien zur Klärung der Fragestellung, ob IGRA-Testsysteme geeignet sind, Personen mit LTBI, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer aktiven Tuberkulose haben, zu identifizieren.
4. Studien zur kombinierten Nutzung von THT und einem IGRA mit RD1-Antigenen, auch unter kosteneffizienten Gesichtspunkten.
5. Studien zur Beurteilung von IGRA-Testsystemen zum Monitoring von Chemotherapien, bzw. als Verlaufsparemeter nach einer Therapie.

### 4.4 Fazit

In dieser Studie konnte an einer großen Anzahl von Kontaktpersonen einer Person mit ansteckungsfähiger Lungentuberkulose ein neuer MTB-spezifischer ELISPOT an mononukleären Zellen des Bluts mit dem klassischen THT im Rahmen einer Umgebungsuntersuchung verglichen werden. Dabei korrelierte ein positives Ergebnis im ELISPOT besser mit einem engen Kontakt zum Index-Patienten und war, im Gegensatz zum THT, unabhängig von einer vorangegangenen BCG-Impfung. In dieser Kohorte von Kontaktpersonen, unter denen sich eine große Anzahl BCG-geimpfter Personen befand, mussten mehr als 80 Prozent der positiven THT-Ergebnisse als falsch-positiv im Hinblick auf eine Infektion mit MTB gewertet werden. Vor Einleitung einer Chemotherapie sollte zur Sicherung der Diagnose einer LTBI daher immer ein IGRA durchgeführt werden.

Bei den Kriterien des DZK für Positivität des THT zur Indikation einer Chemotherapie bei LTBI fehlt eine Stratifikation in BCG-geimpfte/nicht-BCG-geimpfte Kontaktpersonen. Gemäß den deutschen Kriterien zählten die Kontaktpersonen dieser Studie zur Risiko-Gruppe 1. Danach besteht bei einem Indurationsdurchmesser von  $\geq 5$  mm die Indikation zur Einleitung einer präventiven Chemotherapie.

Eine Revision der Kriterien für Positivität eines THT unter Berücksichtigung epidemiologischer Parameter ist nach aktueller Datenlage unumgänglich.

Als Konsequenz aus den hier vorgestellten Untersuchungsergebnissen und neuen Daten anderer Arbeitsgruppen (77, 86, 93, 95) ist daher zu überlegen, bei BCG-geimpften Personen beziehungsweise Personen mit gelegentlichem Kontakt zu einem Index-Fall einen Indurationsdurchmesser von  $\geq 10$  mm für Positivität zugrunde zu legen.

## 5. Zusammenfassung

Während einer Tuberkulose-Umgebungsuntersuchung an der Polizeidirektion für Aus- und Fortbildung (Polizeischule) in Eutin, Schleswig-Holstein, wo ein Polizeischüler an einer ansteckungsfähigen Tuberkulose erkrankt war, wurden die Kontaktpersonen mittels THT und einem MTB-spezifischen ELISPOT an PBMCs mit dem ESAT-6 Antigen untersucht. Insgesamt nahmen 369 Kontaktpersonen an der Studie teil. Sechsenddreißig Personen konnten als enge und 333 Individuen als gelegentliche Kontaktpersonen definiert werden.

Mit Hilfe eines Fragebogens wurden vorangegangene BCG-Impfungen, Tuberkulin-Hauttests sowie anamnestiche Daten ermittelt. Zweiundvierzig Prozent der Studienteilnehmer wiesen einen positiven BCG-Impfstatus auf. Bei allen Kontaktpersonen wurde ein THT durchgeführt. Ein Indurationsdurchmesser von  $\geq 5$  mm galt gemäß den Richtlinien des DZK als positiv. Bei sechsendfünfzig THT-positiv getesteten Kontaktpersonen wurde eine ELISPOT-Testung durchgeführt. Hierbei traten bei sieben engen Kontaktpersonen und bei sechs gelegentlichen Kontaktpersonen positive Testresultate auf. Drei von sechs der gelegentlichen Kontaktpersonen waren in der Vergangenheit an einer Tuberkulose erkrankt, zwei dieser Personen wiesen ein positives ELISPOT-Ergebnis auf. Eine Person aus dieser Gruppe hatte einen starken Risikofaktor für eine LTBI. Personen aus der Gruppe der engen Kontaktpersonen hatten keine anderen Risikofaktoren für ein positives ELISPOT-Testergebnis. Es traten keine ELISPOT-positiven/THT-negativen Testergebnisse auf. Allerdings wurden in 43 von 56 Fällen (77 Prozent) ELISPOT-negative/THT-positive Testergebnisse beobachtet. Es muss angenommen werden, dass bei diesen Personen ein falsch-positives Testergebnis für eine Infektion mit MTB vorlag. Keiner von 27 randomisiert ausgewählten, im Hauttest negativ getesteten Probanden, zeigte ein positives ELISPOT-Ergebnis. In einer multiplen Regressionsanalyse war ein positives Testergebnis im THT 19.7 mal (CI 2.0 – 190.2) und ein positives Testergebnis im ELISPOT 29.2 mal (CI 3.5 – 245) mehr mit einem engen als mit einem gelegentlichen Kontakt zum Index-Patienten verknüpft. Im Gegensatz zum THT war das Ergebnis des ELISPOT unanhängig vom BCG-Impfstatus.

Die Übereinstimmung zwischen dem IGRA und dem THT war insgesamt niedrig ( $\kappa = 0.16$ ). Dagegen war die Übereinstimmung zwischen dem ELISPOT und dem THT bei negativem BCG-Impfstatus bei  $\kappa = 0.5$  hoch.

Die mangelnde Übereinstimmung zwischen dem ELISPOT und dem THT bei einem Grenzwert von  $\geq 5$  mm erklärte sich am ehesten durch falsch-positive THT-Ergebnisse nach einer BCG-Impfung. Durch Anheben des Grenzwerts für Positivität von  $\geq 5$  mm auf

$\geq 10$  mm, entgegen den aktuellen Richtlinien des DZK, verbesserte sich die Übereinstimmung zwischen den beiden Testverfahren deutlich und steigerte den  $\kappa$ -Wert auf 0.29 insgesamt und bei den nicht-BCG-geimpften Kontaktpersonen sogar auf 0.6. Damit wirkte sich der Einfluss der BCG-Impfung nicht mehr signifikant auf das Ergebnis des THT aus.

Diese Studie zeigt, dass der MTB-spezifische ELISPOT mit dem ESAT-6 Antigen, neben der Unabhängigkeit des Testergebnisses vom BCG-Impfstatus, besser mit der Exposition gegenüber MTB korreliert als der THT.

Die Ergebnisse dieser Studie sollten in eine Überarbeitung der Richtlinien für Tuberkulose-Umgebungsuntersuchungen in Deutschland einfließen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Fitzgerald D HD. Mycobacterium tuberculosis, in: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of infectious Diseases. 6th ed; 2005.
2. Oh P, Granich R, Scott J et al. Human exposure following Mycobacterium tuberculosis infection of multiple animal species in a Metropolitan Zoo. *Emerg Infect Dis* 2002;8:1290-1293.
3. Global tuberculosis control. Geneva: Communicable Diseases, World Health Organization; 2001.
4. Stewart GR, Robertson BD, Young DB. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol* 2003;1:97-105.
5. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Jama* 1999;282:677-686.
6. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis* 2003;3:578-590.
7. Raviglione MC, Snider, D. E., Jr., Kochi, A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 1995;273:220-226.
8. World Health Organization. Global tuberculosis control surveillance, planning, financing WHO report 2005. Geneva: World Health Organization; 2005.
9. World Health Organization. Regional Office for South-East Asia., World Health Organization. Regional Office for the Western Pacific., Stop TB Partnership (World Health Organization). Tuberculosis control in South-East Asia and Western Pacific regions 2005 a bi-regional report. In. [Manila, Philippines]: World Health Organization, South-East Asia Region, and Western Pacific Region; 2005.
10. RKI. Infektionskrankheiten - Epidemiologisches Bulletin. 2005.
11. WHO-Europa. Tuberkulose-Notstand in der Europäischen Region der WHO; Mehrfachresistenzen u. HIV-Begleitinfektion;. Kopenhagen: WHO-Europa; 2006.
12. World Health Organization. Global tuberculosis control : surveillance, planning, financing. Geneva: World Health Organization; 2006.
13. RKI. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland. 2003; Robert-Koch-Institut Berlin, 2005.
14. RKI. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2004;. Robert-Koch-Institut Berlin, 2006.
15. Forssbohm M. HW. Tuberkulose-Epidemiologie in Deutschland. Atemwegs- und Lungenkrankheiten 2004;30:269-275.
16. Small PM, Fujiwara PI. Management of tuberculosis in the United States. *N Engl J Med* 2001;345:189-200.
17. Luelmo F. BCG vaccination. *Am Rev Respir Dis* 1982;125:70-72.
18. Menzies R, Vissandjee B. Effect of bacille Calmette-Guerin vaccination on tuberculin reactivity. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:621-625.
19. Mantoux C. L'intradermo-réaction à la tuberculine et son interprétation clinique. *Presse méd.* Paris 1910;18.
20. Mendel F. Die von Pirquetsche Hautreaktion und die intravenöse Tuberkulinbehandlung. *Med. Klin.* 1908;12:402-404.
21. Schaberg T, Hauer B, Haas WH et al. Latente tuberkulöse Infektion: Empfehlungen zur präventiven Therapie bei Erwachsenen in Deutschland; Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose. *Pneumologie* 2004;58:255-270.
22. Sokal JE. Editorial: Measurement of delayed skin-test responses. *N Engl J Med* 1975;293:501-502.

23. Ferlinz R. Richtlinien für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose. Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose. 1996;58:657-665.
24. Rieder HL. [Theoretical and practical considerations of the use of the tuberculin test]. *Pneumologie* 1997;51:1025-1032.
25. Cauthen GW, Valwy S.E. . Tuberculin reactions read at 2 and 7 days. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:A101.
26. Orme IM, Andersen P, Boom WH. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1993;167:1481-1497.
27. Bloom BR, Flynn J, McDonough K, Kress Y, Chan J. Experimental approaches to mechanisms of protection and pathogenesis in *M. tuberculosis* infection. *Immunobiology* 1994;191:526-536.
28. Rook GWA BB. Mechanisms of pathogenesis in tuberculosis. In: Bloom BR (eds.). *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. Washington, DC 20005: Am Soc. Microbiol. 1994:485-502.
29. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This is a Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). This statement was endorsed by the Council of the Infectious Diseases Society of America. (IDSA), September 1999, and the sections of this statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:S221-247.
30. Screening for tuberculosis and tuberculosis infection in high-risk populations. Recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR Recomm Rep* 1995;44:19-34.
31. Huebner RE, Schein MF, Bass JB, Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis* 1993;17:968-975.
32. Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Clinical practice. Latent tuberculosis infection. *N Engl J Med* 2002;347:1860-1866.
33. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000;356:1099-1104.
34. Snider DE, Jr. Bacille Calmette-Guerin vaccinations and tuberculin skin tests. *J. Am. Med. Assoc.* 1985;253:3438-3439.
35. Edwards PQ, Edwards LB. Story of the tuberculin test from an epidemiologic viewpoint. *Am Rev Respir Dis* 1960;81:1-47.
36. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1376-1395.
37. Bearman JE, Kleinman H, Glycer VV, Lacroix OM. A Study of Variability in Tuberculin Test Reading. *Am Rev Respir Dis* 1964;90:913-919.
38. Geng E, Kreiswirth B, Burzynski J, Schluger NW. Clinical and radiographic correlates of primary and reactivation tuberculosis: a molecular epidemiology study. *Jama* 2005;293:2740-2745.
39. Diel R, Meywald-Walter K, Gottschalk R, Rusch-Gerdes S, Niemann S. Ongoing outbreak of tuberculosis in a low-incidence community: a molecular-epidemiological evaluation. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:855-861.
40. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31:406-409.
41. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 2001;357:2017-2021.
42. Streeton JA, Desem N, Jones SL. Sensitivity and specificity of a gamma interferon blood test for tuberculosis infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;2:443-450.

43. Lalvani A, Nagvenkar P, Udhwadia Z et al. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. *J Infect Dis* 2001;183:469-477.
44. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:59-64.
45. Pai M, Gokhale K, Joshi R et al. *Mycobacterium tuberculosis* infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing. *Jama* 2005;293:2746-2755.
46. Dheda K, Rook G, Zumla A. Peripheral T cell interferon-gamma responses and latent tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:97-98; .
47. Ewer K, Deeks J, Alvarez L et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 2003;361:1168-1173.
48. Wood PR, Jones SL. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2001;81:147-155.
49. Brock I, Weldingh K, Leyten EM, Arend SM, Ravn P, Andersen P. Specific T-cell epitopes for immunoassay-based diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol* 2004;42:2379-2387.
50. Dheda K, Udhwadia ZF, Huggett JF, Johnson MA, Rook GA. Utility of the antigen-specific interferon-gamma assay for the management of tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 2005;11:195-202.
51. Pai M, Riley LW, Colford JM, Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004;4:761-776.
52. Rothel JS, Andersen P. Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2005;3:981-993.
53. Arend SM, Andersen P, van Meijgaarden KE et al. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. *J Infect Dis* 2000;181:1850-1854.
54. Brock I, Munk ME, Kok-Jensen A, Andersen P. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:462-467.
55. Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells. *Aids* 2002;16:2285-2293.
56. Munk ME, Arend SM, Brock I, Ottenhoff TH, Andersen P. Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 2001;183:175-176.
57. van Pinxteren LA, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7:155-160.
58. Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P, Cole ST, Brosch R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol* 2004;12:500-508.
59. Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995;63:1710-1717.
60. Sachs L. Applied statistics. Application of statistical methods. 10th. edition ed. Berlin: Springer; 2002.
61. Diel R, Ernst M, Doescher G et al. Avoiding the effect of BCG vaccination in detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection with a blood test. *Eur Respir J* 2006;28:16-23.

62. Small PM, Hopewell PC, Singh SP et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 1994;330:1703-1709.
63. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. American Thoracic Society. *MMWR Recomm Rep* 2000;49:1-51.
64. Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P et al. Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. *J Immunol* 2001;167:5217-5225.
65. Ravn P, Munk ME, Andersen AB et al. Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:491-496.
66. Kang YA, Lee HW, Yoon HI et al. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *Jama* 2005;293:2756-2761.
67. Meier T, Eulenbruch HP, Wrighton-Smith P, Enders G, Regnath T. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:529-536.
68. Ravn P, Munk ME, Andersen AB, et al. The diagnostic potential of the QuantiFERON-RD1 test in patients with active tuberculosis. *Clin Microbiol Infect* 2004;10
69. Johnson PD, Stuart RL, Grayson ML et al. Tuberculin-purified protein derivative-, MPT-64-, and ESAT-6-stimulated gamma interferon responses in medical students before and after *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and in patients with tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:934-937.
70. Lalvani A, Pathan AA, McShane H et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:824-828.
71. Lein AD, von Reyn CF, Ravn P, Horsburgh CR, Jr., Alexander LN, Andersen P. Cellular immune responses to ESAT-6 discriminate between patients with pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex and those with pulmonary disease due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:606-609.
72. Ravn P, Demissie A, Eguale T et al. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1999;179:637-645.
73. Ulrichs T, Anding P, Porcelli S, Kaufmann SH, Munk ME. Increased numbers of ESAT-6- and purified protein derivative-specific gamma interferon-producing cells in subclinical and active tuberculosis infection. *Infect Immun* 2000;68:6073-6076.
74. Vekemans J, Lienhardt C, Sillah JS et al. Tuberculosis contacts but not patients have higher gamma interferon responses to ESAT-6 than do community controls in The Gambia. *Infect Immun* 2001;69:6554-6557.
75. Vincenti D, Carrara S, De Mori P et al. Identification of early secretory antigen target-6 epitopes for the immunodiagnosis of active tuberculosis. *Mol Med* 2003;9:105-111.
76. Wu-Hsieh BA, Chen CK, Chang JH et al. Long-lived immune response to early secretory antigenic target 6 in individuals who had recovered from tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2001;33:1336-1340.
77. Arend SM, Engelhard AC, Groot G et al. Tuberculin skin testing compared with T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:1089-1096.



78. Vekemans J, Ota MO, Sillah J et al. Immune responses to mycobacterial antigens in the Gambian population: implications for vaccines and immunodiagnostic test design. *Infect Immun* 2004;72:381-388.
79. Shams H, Weis SE, Klucar P et al. Enzyme-linked immunospot and tuberculin skin testing to detect latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1161-1168.
80. Doherty TM, Demissie A, Olobo J et al. Immune responses to the Mycobacterium tuberculosis-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* 2002;40:704-706.
81. Scarpellini P, Tasca S, Galli L, Beretta A, Lazzarin A, Fortis C. Selected pool of peptides from ESAT-6 and CFP-10 proteins for detection of Mycobacterium tuberculosis infection. *J Clin Microbiol* 2004;42:3469-3474.
82. Ferrara G, Losi M, D'Amico R et al. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with Mycobacterium tuberculosis: a prospective study. *Lancet* 2006;367:1328-1334.
83. Lee JY, Choi HJ, Park IN et al. Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing Mycobacterium tuberculosis infection. *Eur Respir J* 2006;28:24-30.
84. Wang L, Turner MO, Elwood RK, Schulzer M, FitzGerald JM. A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax* 2002;57:804-809.
85. Rieder HL. Epidemiologic basis of tuberculosis control. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 1999.
86. Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, Follmann F, Andersen P. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:65-69.
87. Mazurek GH, LoBue PA, Daley CL et al. Comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing for detecting latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Jama* 2001;286:1740-1747.
88. Zellweger JP, Zellweger A, Ansermet S, de Senarclens B, Wrighton-Smith P. Contact tracing using a new T-cell-based test: better correlation with tuberculosis exposure than the tuberculin skin test. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9:1242-1247.
89. Lange C, Schaberg T, Diel R, Greinert U. Aktueller Stand der Tuberkulosedagnostik. *Dtsch Med Wochenschr* 2006;131:341-347.
90. Soysal A, Millington KA, Bakir M et al. Effect of BCG vaccination on risk of Mycobacterium tuberculosis infection in children with household tuberculosis contact: a prospective community-based study. *Lancet* 2005;366:1443-1451.
91. Cobelens FG, Verver S. BCG and protection against Mycobacterium tuberculosis infection. *Lancet* 2006;367:392-393; author reply 393-394.
92. Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KL et al. Identification and characterization of the ESAT-6 homologue of Mycobacterium leprae and T-cell cross-reactivity with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 2002;70:2544-2548.
93. Hill PC, Fox A, Jeffries DJ et al. Quantitative T cell assay reflects infectious load of Mycobacterium tuberculosis in an endemic case contact model. *Clin Infect Dis* 2005;40:273-278.
94. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This is a Joint Statement of the American Thoracic Society (ATS) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). This statement was endorsed by the Council of the Infectious Diseases Society of America. (IDSA), September 1999, and the sections of this statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(4 Pt 2):S221-247.

95. Zellweger JP. Handbuch Tuberkulose; Lungenliga Schweiz. Swiss Medical Forum 2003;3:487-491.
96. Rieder H ZJP, Quadri F D, Desgrandchamps D. Dépistage et traitement de l'infection tuberculeuse, vaccination BCG. Swiss Medical Forum 2003;23:531-539.
97. Zellweger JP. Lungenliga Schweiz; Kompetenzzentrum Tuberkulose. 2005.
98. Anergy skin testing and tuberculosis preventive therapy for HIV-infected persons: revised recommendations. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep 1997;46:1-10.
99. Markowitz N, Hansen NI, Wilcosky TC et al. Tuberculin and anergy testing in HIV-seropositive and HIV-seronegative persons. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. Ann Intern Med 1993;119:185-193.
100. Piana F, Codecasa LR, Cavallerio P et al. Use of a T-cell-based test for detection of tuberculosis infection among immunocompromised patients. Eur Respir J 2006;28:31-34.
101. Richeldi L, Ewer K, Losi M et al. Early diagnosis of subclinical multidrug-resistant tuberculosis. Ann Intern Med 2004;140:709-713.
102. Keane J, Gershon S, Wise RP et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. N Engl J Med 2001;345:1098-1104.
103. Huelsemann J.L. HJM, Schnarr S. et al. . Empfehlungen zum Tuberkulose-Screening und zur Therapie der latenten Tuberkulose bei Anti-TNF-a-Therapie mit Infliximab. Ak Rheumatol 2002;27:97-100.
104. Long R, Gardam M. Tumour necrosis factor-alpha inhibitors and the reactivation of latent tuberculosis infection. Cmaj 2003;168:1153-1156.
105. Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Pathan A et al. Ex vivo characterization of early secretory antigenic target 6-specific T cells at sites of active disease in pleural tuberculosis. Clin Infect Dis 2005;40:184-187.
106. Jafari C, Ernst M, Kalsdorf B et al. Rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis by bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot. Am J Respir Crit Care Med 2006;174:1048-1054.
107. Ulrichs T, Anding R, Kaufmann SH, Munk ME. Numbers of IFN-gamma-producing cells against ESAT-6 increase in tuberculosis patients during chemotherapy. Int J Tuberc Lung Dis 2000;4:1181-1183.
108. Al-Attayah R, Mustafa AS, Abal AT, Madi NM, Andersen P. Restoration of mycobacterial antigen-induced proliferation and interferon-gamma responses in peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients upon effective chemotherapy. FEMS Immunol Med Microbiol 2003;38:249-256.
109. Wrighton-Smith P, Zellweger JP. Direct costs of three models for the screening of latent tuberculosis infection. Eur Respir J 2006;28:45-50.
110. Diel R, Nienhaus A, Lange C, Schaberg T. Cost-optimisation of screening for latent tuberculosis in close contacts. Eur Respir J 2006;28:35-44.

## 7. Anhang

### *Fragebogen zum Tuberkulose-Hauttest*

#### Studie zum Tuberkulose-Hauttest

-----

#### Vom Arzt auszufüllen

Patientennummer:

Datum:

Induration \_\_\_\_\_ mm, 48 - 72 h nach intradermaler Injektion von 10 TE

-----

1. Alter: \_\_\_\_\_ Jahre

2. Wo sind Sie aufgewachsen (bitte ankreuzen) ?

Deutschland ( Ost  West)

Ausland: \_\_\_\_\_

3. Wurden Sie in der Vergangenheit gegen Tuberkulose geimpft

(BCG-Impfung) ?

Ja (\_\_\_\_mal)

Nein

unbekannt

4. Wurde bei Ihnen schon einmal ein Tuberkulosehauttest

durchgeführt ?

Ja (in welchem Jahr ? \_\_\_\_\_;  Stempeltest  Inj. i.d. Haut)

Nein

unbekannt

4a. Falls „Ja“, hatten Sie eine positive Hautreaktion ?

Stempeltest:  Ja      Inj. i.d. Haut:  Ja (\_\_\_ mm Ø)

Nein

Nein

unbekannt

unbekannt

5. Waren Sie schon einmal an einer Tuberkulose erkrankt ?

Ja (wann ? \_\_\_\_\_; wie lange wurden Sie behandelt ? \_\_\_\_\_ Monate)

Nein

Verdachtsdiagnose hatte sich nicht bestätigt

6. Hatten Sie in den letzten 6 Monaten

wiederholt Fieber ?

Gewichtsverlust ?

neu aufgetretenen Husten ?

7. Hatten Sie bewussten Kontakt zu einem Menschen mit ansteckender

Lungentuberkulose ?

in den letzten 6 Monaten

vor 6 Monaten – 3 Jahren

länger als 3 Jahre zurück

8. Leiden Sie an einer der folgenden Erkrankungen ?

Diabetes mellitus, andere Stoffwechselkrankheit (welche: \_\_\_\_\_)

chron. Nieren- o. Lebererkrankung

chron. Infektionskrankheit (z.B. Virushepatitis)

## 8. Danksagung

Herrn PD Dr. med. C. Lange, Leiter der Laborgruppe Klinische Infektiologie am Forschungszentrum Borstel und Oberarzt der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, sowie seine Anregungen und Förderung der Arbeit. Ich bedanke mich sowohl für die sehr gute, kontinuierliche, überaus geduldige und herzliche Betreuung, als auch für die anregenden Diskussionen, wertvollen Ratschläge und Ermutigungen.

Herr Prof. Dr. med. P. Zabel, Direktor des Forschungszentrums Borstel, Direktor der Medizinischen Klinik des Forschungszentrums Borstel und Direktor der III. Medizinischen Klinik des Universitäts-Krankenhauses Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, förderte die Entstehung der Promotionsarbeit nachdrücklich. Für seine stete Unterstützung möchte ich Ihm sehr herzlich danken.

Frau Dr. med. L. Visuri-Karbe, leitende Polizeiärztin der Polizeidirektion für Aus- und Fortbildung in Eutin, Schleswig-Holstein und den Mitarbeitern vom ärztlichen Dienst danke ich für die große, mannigfaltige Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen und Testverfahren.

Herrn Dr. rer. nat. M. Ernst, Leiter der Laborgruppe Immuzellanalytik am Forschungszentrum Borstel danke ich für die überaus freundliche, hilfreiche und fachkundige Unterstützung im Labor.

Herrn PD Dr. rer. nat. S. Niemann, Leiter der Laborgruppe Molekulare Mykobakteriologie am Forschungszentrum Borstel danke ich für die Hilfe bei der molekularen Stammtypisierung und für die freundliche Überlassung des Fotos des Spoligotypisierungsmusters.

Herrn PD Dr. med. R. Diel, Leiter des Gesundheitsamtes Hamburg-Harburg danke ich für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Max-Michel, meinem Sohn, der in dieser Phase meines Lebens oft zurückstecken musste, danke ich ganz besonders.

Herrn C. Thöla, Frau J. Heinrich und Frau J. Mohr möchte ich herzlich für die Hilfe bei der Textverarbeitung danken.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten



Gabriele Ruth Döscher, geb. Nagel;  
geboren am 31.05.1962 in Offenbach am Main / Deutschland  
als ältestes Kind von Siegfried Nagel, Maschinenbaumeister und  
Ruth Nagel, geb. Schäfer, Hausfrau;  
geschieden von Ralf Döscher, ein Sohn, Max-Michel, geb. am 09.06. 1998  
in Hamburg/ Deutschland

### Schulbildung

09 /1969 – 08 /1972 Besuch der Grundschule Schulstrasse, Dietzenbach/Deutschland  
06 /1981 Erlangung der Hochschulreife (Abitur) am Adolf-Reichwein-Gymnasium in  
Heusenstamm/Deutschland

### Medizinstudium

10 /1989 – 04 /1998 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg /Deutschland  
04 /1994 Physikum  
04 /1995 1. Staatsexamen  
04 /1997 2. Staatsexamen  
04 /1998 3. Staatsexamen

### Berufstätigkeit

07 /1981 – 12 /1982 Aufenthalt in Clearwater Beach/ Florida, USA als Au pair,  
Sachbearbeiterin im Vertrieb für Verfahrenstechnik, K. Schäfer GmbH, Langen  
Reservation Agent, Hertz Autovermietung Headquarter, Frankfurt a. Main  
02 /1983 – 09 /1996 Flugbegleiterin bei Deutsche Lufthansa AG  
02 /2001 – 01 /2002 Arzt im Praktikum in der Abteilung für Anästhesie, Parkklinik Manhagen,  
Großhansdorf, CA Dr. med. H. Uhl  
02 /2002 – 10 /2002 Medizinische Klinik Forschungszentrum Borstel  
CA Prof. Dr. med. P. Zabel  
11/2002 Approbation als Ärztin

### Weiterbildung

11 /2002 – 04 /2004 Assistenzärztin, Medizinische Klinik Forschungszentrum Borstel,  
CA Prof. Dr. med. P. Zabel  
05 /2004 – 05 /2005 Assistenzärztin, Abteilung für Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Freudenstadt,  
CA Dr. med. E. Arnold  
06 /2005 – 12/2006 Assistenzärztin, Abteilung für Strahlentherapie, Kreisklinikum Traunstein,  
CÄ Dr. med. M. Gluth-Stender  
seit 01/2007 Assistenzärztin in der Praxis für Chirurgie, Dr. med. W. Schaffler, Traunstein

## 9.1. Publikationsverzeichnis

### Originalarbeiten

---

- Februar 2006      Diel R., Ernst M., Döscher G., Visuri-Karbe L., Greinert U., Niemann S.,  
Nienhaus A., Lange C. Avoiding the effect of BCG vaccination in detecting  
*Mycobacterium tuberculosis* infection with a blood test  
*European Respiratory Journal* 2006; 28: 16 - 23