

Aus dem Forschungszentrum Borstel  
Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften  
Direktor: Prof. Dr. med. P. Zabel

---

**Evaluation eines neuen Testverfahrens zur Diagnose  
der latenten Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis*  
bei Umgebungsuntersuchungen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
– aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von  
Benjamin Krummel  
aus Berlin

Lübeck 2011

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dipl.-Biol. Christoph Lange
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Egbert Herting

**Tag der mündlichen Prüfung: 7.6.2011**

**Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 7.6.2011**

Wenn die Zahl der Opfer, welche eine Krankheit fordert, als Massstab für ihre Bedeutung zu gelten hat, dann müssen alle Krankheiten, namentlich aber die gefürchtetsten Infektionskrankheiten, Pest, Cholera u. s. w. weit hinter der Tuberculose zurückstehen. Die Statistik lehrt, dass  $\frac{1}{7}$  aller Menschen an Tuberculose stirbt und dass, wenn nur die mittleren productiven Altersklassen in Betracht kommen, die Tuberculose ein Drittel derselben und oft mehr dahinrafft.

Robert Koch, Die Aetiologie der Tuberculose. Berliner Klinische Wochenschrift, 1882;19:221-230.

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>                                                                                                                                                        | <b>1</b>  |
| 1.1 Epidemiologie der Tuberkulose                                                                                                                                           | 1         |
| 1.2 Pathogenese der Tuberkulose                                                                                                                                             | 3         |
| 1.3 Prävention der Tuberkulose                                                                                                                                              | 4         |
| 1.4 Immundiagnostik der Infektion mit <i>M. tuberculosis</i>                                                                                                                | 5         |
| 1.5 Ein Lehrer mit ansteckender Lungentuberkulose (Indexfall)                                                                                                               | 11        |
| 1.6 Fragestellung und Zielsetzung                                                                                                                                           | 12        |
| <br>                                                                                                                                                                        |           |
| <b>2. Material und Methoden</b>                                                                                                                                             | <b>14</b> |
| 2.1 Indexfall und Kontaktpersonen                                                                                                                                           | 14        |
| 2.2 Tuberkulin-Hauttest (THT)                                                                                                                                               | 18        |
| 2.3 Interferon- $\gamma$ Enzyme-linked Immunospot (IFN- $\gamma$ ELISPOT)                                                                                                   | 19        |
| 2.4 Interleukin-2 Enzyme-linked Immunospot (IL-2 ELISPOT)                                                                                                                   | 20        |
| 2.5 Untersuchung des beim Indexpatienten isolierten <i>M. tuberculosis</i> -Stammes                                                                                         | 20        |
| 2.6 Statistische Methoden                                                                                                                                                   | 22        |
| <br>                                                                                                                                                                        |           |
| <b>3. Ergebnisse</b>                                                                                                                                                        | <b>24</b> |
| 3.1 Exposition der Kontaktpersonen                                                                                                                                          | 24        |
| 3.2 Ergebnisse der Tuberkulin-Hauttests                                                                                                                                     | 27        |
| 3.3 Testergebnisse des Interferon- $\gamma$ ELISPOT                                                                                                                         | 27        |
| 3.4 Testergebnisse des Interleukin-2 ELISPOT                                                                                                                                | 28        |
| 3.5 Auswertung der Fragebögen                                                                                                                                               | 29        |
| 3.6 Zusammenhang der Testergebnisse mit Expositionsdauer und BCG-Impfstatus                                                                                                 | 31        |
| 3.7 Genotypisierung des beim Indexpatienten isolierten <i>M. tuberculosis</i> -Stammes und Analyse der durch diesen Stamm induzierten TNF- $\alpha$ -Bildung <i>ex vivo</i> | 33        |
| <br>                                                                                                                                                                        |           |
| <b>4. Diskussion</b>                                                                                                                                                        | <b>35</b> |
| 4.1 Allgemeines                                                                                                                                                             | 35        |
| 4.2 Grundsätzliches zu Umgebungsuntersuchungen                                                                                                                              | 35        |

|                                                                                                                                  |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 4.3 Sensitivität und Spezifität des THT                                                                                          | 36     |
| 4.4 Sensitivität und Spezifität des IFN- $\gamma$ ELISPOT                                                                        | 37     |
| 4.5 Positiver prädiktiver Wert von THT und IFN- $\gamma$ ELISPOT                                                                 | 41     |
| 4.6 Übereinstimmung von THT- und IFN- $\gamma$ ELISPOT-Ergebnissen                                                               | 43     |
| 4.7 Unklare ELISPOT-Ergebnisse                                                                                                   | 44     |
| 4.8 Testkonversion und -reversion                                                                                                | 45     |
| 4.9 Interleukin-2 ELISPOT                                                                                                        | 45     |
| 4.10 <i>M. tuberculosis</i> -Übertragung und Fälle von LTBI                                                                      | 47     |
| 4.11 Analyse der durch den <i>M. tuberculosis</i> -Stamm des Indexpatienten<br>induzierten TNF- $\alpha$ -Bildung <i>ex vivo</i> | 48     |
| 4.12 Einschränkungen                                                                                                             | 49     |
| 4.13 Offene Fragen                                                                                                               | 50     |
| 4.14 Fazit                                                                                                                       | 51     |
| <br>5. Zusammenfassung                                                                                                           | <br>52 |
| <br>6. Literaturverzeichnis                                                                                                      | <br>54 |
| <br>7. Anhang                                                                                                                    | <br>62 |
| <br>8. Danksagung                                                                                                                | <br>63 |
| <br>9. Lebenslauf                                                                                                                | <br>64 |

## Abkürzungsverzeichnis

AID: Advanced Imaging Devices

AIDS: Acquired immunodeficiency syndrome

BAL: Bronchoalveoläre Lavage

BCG: Bacille Calmette-Guérin

BCIP/NBT: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat/Nitroblau-Tetrazolium

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CFP-10: Culture filtrate protein 10

DNA: Desoxyribonucleic acid

DZK: Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose

ELISA: Enzyme-linked immuno-sorbent assay

ELISPOT: Enzyme-linked immuno-spot assay

ESAT-6: Early secretory antigenic target 6

HIV: Human immunodeficiency virus

IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$

IGRA: Interferon- $\gamma$  release assay

IL-2: Interleukin 2

IQR: Interquartile range

KI: Konfidenzintervall

LTBI: Latente Infektion mit *M. tuberculosis*

MDM: Monocyte-derived macrophages

MDR-TB: Multidrug-resistant tuberculosis

MIRU-VNTR: Mycobacterial interspersed repetitive unit - variable number of tandem repeats

MOI: Multiplicity of infection

MTB: Mycobacterium tuberculosis

NTM: Nichttuberkulöse Mykobakterien

OR: Odds ratio

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase chain reaction

PPD: Purified protein derivate

PPW: Positiver prädiktiver Wert

RD-1: Region of difference 1

SFC: Spot-forming cells  
SSI: Statens Serum Institut  
STIKO: Ständige Impfkommission  
TB, TBC: Tuberkulose  
THT: Tuberkulin-Hauttest  
TNF- $\alpha$ : Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$   
TU: Tuberculin units  
WHO: World Health Organization  
XDR-TB: Extensively drug-resistant tuberculosis

# 1. Einleitung

## 1.1 Epidemiologie der Tuberkulose

Die Tuberkulose ist eine Infektionskrankheit, die durch Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes hervorgerufen wird. Dies sind stäbchenförmige, aerobe, nicht sporenbildende, säurefeste Bakterien aus der Familie der Mycobacteriaceae (1). Der *M. tuberculosis*-Komplex umfasst neben *M. tuberculosis var. tuberculosis* auch *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. canetti*, *M. microti* und *M. pinnipedii*. Die Tuberkulose tritt sowohl beim Menschen als auch bei Tieren auf, u.a. bei Paarhufern (*M. bovis*), Nagetieren (*M. microti*) und Robben (*M. pinnipedii*) (1, 2).

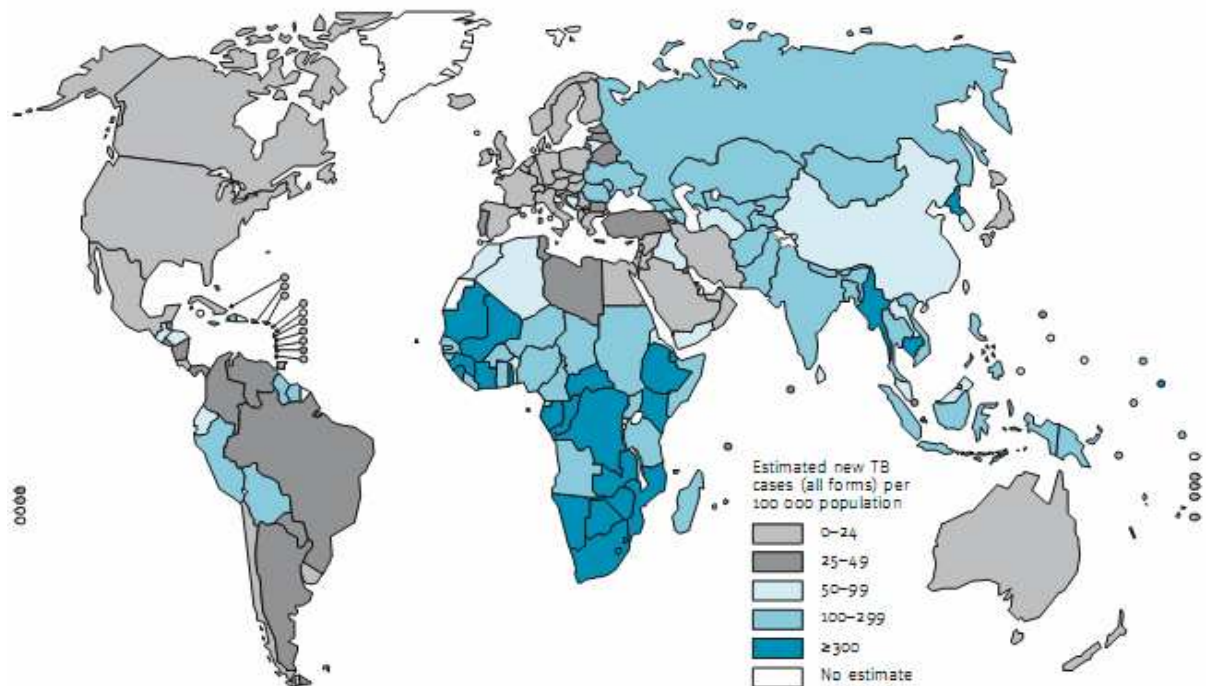
Hinweise auf Tuberkuloseinfektionen beim Menschen finden sich in Form von DNA-Spuren bereits an 5000, 3200 bzw. 2300 Jahre alten menschlichen Skeletten aus Ägypten, Indien und China (3-5). Die Tuberkulose existierte in Amerika vor der Ankunft Kolumbus (6, 7) und in Borneo vor der Ankunft der ersten Europäer (8). Von Hippokrates (ca. 460-370 v. Chr.) stammen wahrscheinlich die ersten Beschreibungen der klinischen Verlaufsformen der Lungentuberkulose („Phtisis“) (9). Der englische Arzt Benjamin Marten vermutete 1720 als erster, die Tuberkulose könne verursacht sein durch “wonderful minute living creatures“ (10). Robert Koch (1843-1910) entdeckte 1882 *M. tuberculosis* als Erreger der Tuberkulose (11).

Besondere Bedeutung erlangte die Tuberkulose erst im 19. Jahrhundert zu Beginn der industriellen Revolution. In den Armutsvierteln der europäischen Großstädte führten vor allem hohe Bevölkerungsdichten, Unterernährung und schlechte hygienische Bedingungen zu wiederholten Pandemien. In London, Stockholm und Hamburg verursachte die Tuberkulose zu Beginn des 19. Jahrhunderts 800-1000 Todesfälle pro 100 000 Einwohner (12), in London war im Jahr 1815 jeder vierte Todesfall durch die Tuberkulose verursacht (13).

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist derzeit etwa ein Drittel der Weltbevölkerung mit *M. tuberculosis* infiziert, 5-10% der Infizierten sollen im Laufe ihres Lebens an einer Tuberkulose erkranken (14). Diese Angaben sind jedoch sehr unsicher.



Im Jahr 2009 wurden weltweit 9,4 Millionen Neuerkrankungen und knapp 1,7 Millionen Todesfälle registriert, darunter 380.000 Todesfälle bei HIV-Infizierten (14). Der Großteil der Neuerkrankungen trat dabei in Südostasien (35%) und in Afrika (30%) auf. Besonders in Afrika geht die Zunahme der Tuberkulose eng mit der HIV-Epidemie einher (14, 15). Weltweit ist die Tuberkulose die häufigste Todesursache bei HIV-seropositiven Patienten.



**Abbildung 1:** Geschätzte Tuberkulose-Inzidenzraten 2009 (Quelle: World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO Report 2010).

Weitere besorgniserregende Entwicklungen sind die Zunahme multiresistenter Stämme (engl.: multidrug-resistant [MDR] tuberculosis; Resistenz gegenüber mindestens Isoniazid und Rifampizin), besonders dramatisch in Aserbaidschan, Moldawien und Tadschikistan, wo 22%, 19% bzw. 17% der Neuinfektionen als MDR-Tuberkulose zu klassifizieren sind (14), sowie das Auftreten von XDR (extensively drug-resistant)-Tuberkulose, zuerst gemeldet aus KwaZulu-Natal, Südafrika (16). Die XDR-Tuberkulose ist dabei definiert als Resistenz gegenüber Isoniazid, Rifampizin, mindestens einem Fluorochinolon und mindestens einem der intravenös verabreichten Antibiotika Amikacin, Capreomycin oder Kanamycin (17).

In Deutschland wurden im Jahr 2008 4543 Neuerkrankungen gemeldet, im Jahr 2007 waren es 4998 (18). Die Inzidenz lag damit bei 5,5 pro 100.000 Einwohner, die Letalität lag bei 3,5%. Unter in Deutschland lebenden ausländischen Staatsbürgern ist die Inzidenz etwa 5,3mal höher (20,7 pro 100.000) als bei Deutschen (3,9 pro 100.000). Bei Kindern unter 15 Jahren lag die Inzidenz 2008 bei 1,1. Kinder mit ausländischer Staatsangehörigkeit erkrankten im Vergleich zu deutschen Kindern rund siebenmal so häufig an einer Tuberkulose. Der Anteil multiresistenter Stämme sank von 2,0% im Jahr 2007 auf 1,5% 2008 (18).

## **1.2 Pathogenese der Tuberkulose**

Die Infektion mit *M. tuberculosis* erfolgt nahezu ausschließlich inhalativ, die Übertragung geschieht durch Husten und Niesen, selten durch Sprechen. Die Bakterien gelangen im Aerosol z.T. bis in die Alveolen und werden dort von neutrophilen Granulozyten, Alveolarmakrophagen und dendritischen Zellen phagozytiert, jedoch nicht immer abgetötet (19).

Die Primärinfektion mit *M. tuberculosis* betrifft praktisch ausschließlich die Lunge. Sie bleibt häufig unbemerkt oder geht mit nur geringem Krankheitsgefühl einher. Bei intakten immunologischen Abwehrmechanismen des Organismus gegen *M. tuberculosis* kommt es zur Ausbildung von Granulomen im Lungenparenchym. Diese „Tuberkel“ und die ebenfalls reagierenden Hiluslymphknoten bilden den sog. Primärkomplex. Es kommt zu Vernarbungen und Verkalkungen, das Auftreten radiologischer Veränderungen ist dabei deutlich mit dem Immunstatus des Patienten assoziiert (20).

Als latente Infektion mit *M. tuberculosis* (LTBI) wird die Situation bezeichnet, in der die Bakterien vermutlich in Granulomen abgekapselt leben und so jahrzehntelang persistieren können. Dabei ist der Begriff der „Infektion“ irreführend: Die LTBI wird nicht über den mikrobiologischen Nachweis von *M. tuberculosis* definiert, sondern über eine positive Immunreaktion im Tuberkulin-Hauttest (THT) oder in einem Interferon- $\gamma$  release assay (IGRA) in Abwesenheit einer aktiven Tuberkulose. Welcher Anteil von Personen, die eine positive Immunreaktion im THT oder in einem IGRA aufweisen, tatsächlich mit lebenden *M. tuberculosis* infiziert ist, ist unklar (21).

Ein Teil der Menschen mit einer LTBI entwickelt im Laufe des Lebens eine aktive Tuberkulose. Dieser Anteil ist historisch mit 5-10% quantifiziert worden, nach neueren Untersuchungen ist der Anteil wahrscheinlich höher (22, 23). Das Risiko einer manifesten Erkrankung ist dabei abhängig von der Virulenz der Erreger und der individuellen Immunantwort und ist in den ersten beiden Jahren nach Primärinfektion am höchsten (24). Die aktive Tuberkulose entsteht entweder postprimär als endogene Reaktivierung aus der LTBI oder beim Immunkompetenten seltener primär. Es kommt zu pulmonalen oder extrapulmonalen Organmanifestationen oder bei hämatogener Streuung zur Miliartuberkulose. Bei Kindern und immunsupprimierten Erwachsenen sind primäre sowie extrapulmonale Verlaufsformen häufiger (14). Klinische Symptome der manifesten Tuberkulose sind Husten, Inappetenz, Hämoptysen und B-Symptomatik (Fieber, Gewichtsverlust, Nachtschweiß) (18).

### **1.3 Prävention der Tuberkulose**

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wurde eine Schutzimpfung gegen die Tuberkulose entwickelt. Diese Impfung ist heute die weltweit am häufigsten verwendete Impfung (25). Der Impfstoff besteht aus lebenden, attenuierten Mykobakterien des Stammes *M. bovis Bacille Calmette-Guérin* (BCG). Die Impfung kann bei Kindern schwere Verlaufsformen wie z.B. die Meningitis tuberculosa verhindern (26), bietet jedoch keinen Schutz vor Erkrankung im Erwachsenenalter und wird deshalb in vielen Ländern mit niedriger Inzidenz nicht mehr angewendet. In Deutschland wird die BCG-Impfung seit 1998 nicht mehr von der ständigen Impfkommision (STIKO) empfohlen. Die WHO hat vorgeschlagen, in Populationen, in denen das Infektionsrisiko für Tuberkulose unter 0,1% liegt, keine generelle BCG-Impfung durchzuführen (14).

Eine erfolgreiche Impfung führt, wie die Infektion mit *M. tuberculosis* (27), in der Regel nach 6-8 Wochen zu einer positiven Hautreaktion im Tuberkulin-Hauttest. Bezüglich der Zeitspanne, über die der Hauttest nach der Impfung positiv bleibt, existieren unterschiedliche Angaben. Von einer linearen Beziehung zwischen Zeitspanne und Hautreaktion kann dabei jedoch nicht ausgegangen werden (28).

#### **1.4 Immundiagnostik der Infektion mit *M. tuberculosis***

Seit rund 100 Jahren wird zur Immundiagnostik der Infektion mit *M. tuberculosis* der durch Clemens von Pirquet 1907 eingeführte (29) und durch Felix Mendel (1908) und Charles Mantoux (1910) weiter entwickelte Tuberkulin-Hauttest (30, 31) verwendet. Bis heute gehört dieser Test zur Standarddiagnostik der LTBI.

Der THT basiert auf einer T-Zell-vermittelten Reaktion vom Spättyp gegenüber einer Mischung von rund 200 Antigenen, die nicht nur bei *M. tuberculosis*, sondern auch im Impfstamm *M. bovis* BCG sowie in vielen nicht-tuberkulösen Mykobakterien (NTM) vorkommen (27, 32-35).

In Deutschland ist seit August 2005 das Tuberkulin RT 23 SSI (Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark) für die Hauttestung zugelassen. Die Standarddosis beträgt 2 TU/0,1 ml. Die Testung erfolgt durch intrakutane Injektion des Tuberkulins mittels einer 27-Gauge-Nadel an der unbehaarten Beugeseite des Unterarms. Bereits nach 5-6 Stunden beginnt die Hautreaktion, die ihr Maximum nach 48-72 Stunden erreicht. Bei stärkeren Reaktionen kann es auch zu Blasenbildung und Nekrosen kommen. Das Ablesen des Tests erfolgt nach 48-72 Stunden durch Ausmessen der Induration quer zur Unterarmachse mit der sog. „Kugelschreibermethode“ (35, 36) und wird in Millimetern dokumentiert.

Die Kriterien für eine Beurteilung als positives Ergebnis variieren, je nachdem, welcher Risikogruppe der Proband angehört: Eine Induration  $\geq 5$  mm gilt als positiv, wenn der Getestete in den letzten zwei Jahren Kontakt zu Personen mit ansteckender Tuberkulose hatte oder immunsupprimiert ist (durch HIV-Infektion, systemische Kortikoiddauertherapie, Therapie mit TNF-Antagonisten sowie nach Organtransplantation). Außerdem gilt dieser Grenzwert beim Nachweis radiologischer Residuen einer alten Tuberkulose ohne Anhalt für eine behandlungsbedürftige Tuberkuloseerkrankung und ohne vorausgegangene Therapie (36, 37).

Bei Kindern unter vier Jahren sowie bei Kindern und Jugendlichen mit Kontakt zu Risikogruppen gilt ein Indurationsdurchmesser  $\geq 10$  mm als positives Ergebnis. Derselbe Grenzwert wird angewendet bei Obdachlosen, Bewohnern und

Angestellten von Gefängnissen und Pflegeheimen sowie bei Mitarbeitern von Krankenhäusern und mykobakteriologischen Laboratorien. Ebenfalls zu dieser Gruppe zählen Patienten mit Silikose, Diabetes mellitus, malignem Lymphom, Leukämie, Kopf-Hals-Karzinom, Gewichtsverlust  $\geq 10\%$  des Idealgewichts, Z.n. Gastrektomie, Z.n. jejunioilealem Bypass oder chronischer Niereninsuffizienz sowie bei intravenösem Drogenabusus. Weiterhin gilt dieser Grenzwert für Immigranten innerhalb von fünf Jahren nach der Einreise aus einem Land mit hoher Tuberkuloseprävalenz (36, 37).

Ein Induration mit einem Durchmesser  $\geq 15$  mm wird als positiv gewertet bei allen Personen ohne aktuelle Risikofaktoren für eine *M. tuberculosis*-Infektion sowie bei BCG-geimpften Kindern (36, 37).

Die Spezifität des THT ist durch BCG-Impfung und Kontakt mit NTM eingeschränkt (27, 32-34). Die Sensitivität des Tests ist vermindert bei malignen Erkrankungen, bei zellulären Immundefekten wie HIV (38), bei iatropher Immunsuppression und bei akuten oder kurz zurückliegenden schweren Virusinfektionen (Influenza, Masern, Röteln und Windpocken). Ebenfalls falsch-negative THT-Ergebnisse finden sich bei fulminanter tuberkulöser Erkrankung (z.B. Miliartuberkulose) sowie bei Sarkoidose und bei älteren Menschen, außerdem bis zu 6 Wochen nach einer Lebendimpfung (33, 37).

Das Anlegen, das Ablesen und die Interpretation des THT unterliegen intra- und interindividuellen Schwankungen. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Patienten nach 48-72 Stunden zum Ablesen des Testergebnisses erneut erscheinen müssen.

Eine positive Hautreaktion findet sich sowohl bei frischen (2-10 Wochen zurückliegenden) als auch bei Jahrzehnte zurückliegenden Infektionen (39) sowie auch noch Jahrzehnte nach einer BCG-Impfung (34). Auch eine Unterscheidung zwischen LTBI und aktiver Tuberkulose ist mit dem THT nicht möglich (39).

Trotz der oben erwähnten vielfältigen Problematiken in der Verwendung des THT als alleinigem Diagnostikum der LTBI wurde bis vor einigen Jahren wenig an der Entwicklung alternativer Testmethoden geforscht.

Mit der Entdeckung von *M. tuberculosis*-Antigenen, die in *M. bovis* BCG (40) und in den meisten NTM (41) nicht vorkommen, konnten Ende der 1990er Jahre zum ersten Mal Tests entwickelt werden, die unabhängig von vorausgegangener BCG-Impfung und Kontakt zu NTM sind (42).

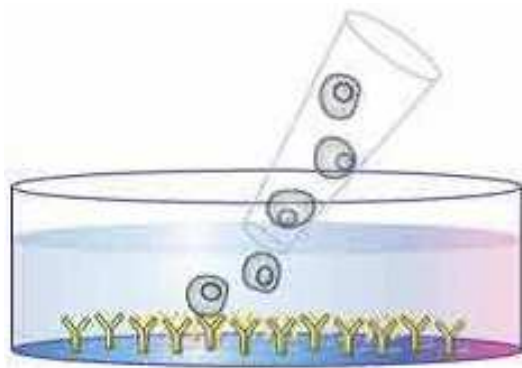
Zwei dieser *M. tuberculosis*-spezifischen Antigene sind *Early secretory antigenic target* (ESAT)-6 und *Culture filtrate protein* (CFP)-10, die in der *Region of difference 1* (RD-1) des *M. tuberculosis*-Genoms kodiert sind und mit der Virulenz der Mykobakterien in Zusammenhang stehen (43). Für beide Proteine fehlen die entsprechenden Sequenzen im Genom des Impfstammes *M. bovis* BCG und bei den meisten NTM-Stämmen (40, 44), Ausnahmen bilden dabei *M. kansasii*, *M. marinum* und *M. szulgai* (45). Auch Kreuzreaktionen mit *M. leprae* sind beschrieben. Die genaue Funktion von ESAT-6 und CFP-10 *in vivo* ist nicht bekannt.

Bei mit *M. tuberculosis* infizierten Patienten stimulieren *M. tuberculosis*-spezifische Antigene wie ESAT-6 und CFP-10 die Produktion von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) durch *M. tuberculosis*-spezifische T-Helferzellen (46-48). Diese Immunantwort bildet die Grundlage der modernen Interferon- $\gamma$  release assays (IGRA).

Einer der beiden Tests, der *Enzyme-linked Immunospot Assay* (ELISPOT) weist einzelne Antigen-spezifische T-Zellen nach (49, 50). Hierzu wird zunächst aus heparinisiertem, venösem Blut das Blutvolumen bestimmt, in dem sich eine definierte Anzahl mononukleärer Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) befindet, i.d.R. 250.000 Zellen.

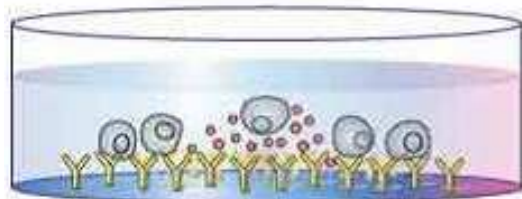
Dieses Blutvolumen wird zusammen mit den Antigenen ESAT-6 und/oder CFP-10 in die Nöpfchen einer Mikrotiterplatte pipettiert, die (beim IFN- $\gamma$  ELISPOT) mit anti-Interferon- $\gamma$ -Antikörpern beschichtet sind. Die Zellen werden mit den Antigenen über Nacht inkubiert. Nach Infektion mit *M. tuberculosis* und Kontakt mit ESAT-6 und CFP-10 *in vivo* produzieren die T-Helferzellen nach erneutem Kontakt *in vitro* Interferon- $\gamma$ , das am Boden der Mikrotiterplatten an die anti-Interferon- $\gamma$ -Antikörper bindet. Durch Zugabe eines zweiten Antikörpers kann dann gebundenes Interferon- $\gamma$  am Boden der Platten in einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden.

Jede Interferon- $\gamma$ -produzierende, also weitgehend *M. tuberculosis*-spezifische Zelle bildet einen Punkt am Boden der Mikrotiterplatte. Das Ergebnis wird in punktbildenden Zellen (engl.: spot-forming cells, SFC) pro 250.000 mononukleären Zellen angegeben. In **Abbildung 2** ist die Funktionsweise des ELISPOT-Verfahrens grafisch dargestellt.

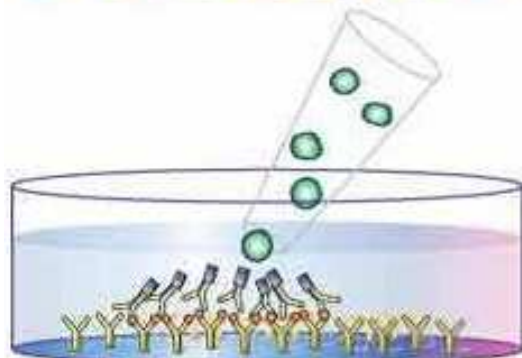


Der *Enzyme-linked Immunospot Assay* (ELISPOT) weist einzelne Antigen-spezifische T-Zellen nach:

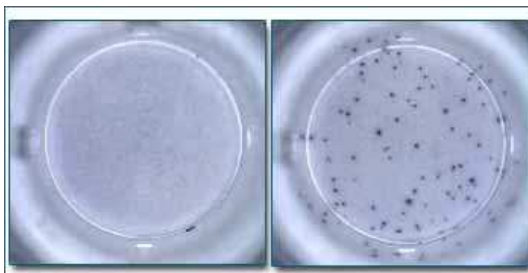
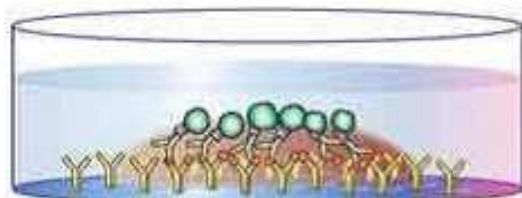
Eine definierte Anzahl mononukleärer Zellen wird zusammen mit den Antigenen ESAT-6 und/oder CFP-10 in die Näpfchen einer Mikrotiterplatte pipettiert, die (beim IFN- $\gamma$  ELISPOT) mit anti-Interferon- $\gamma$ -Antikörpern beschichtet sind.



Nach Infektion mit *M. tuberculosis* und Kontakt mit ESAT-6 und CFP-10 *in vivo* produzieren die T-Helferzellen nun nach erneutem Kontakt *in vitro* Interferon- $\gamma$ , das am Boden der Mikrotiterplatten an die anti-Interferon- $\gamma$ -Antikörper bindet.



Durch Zugabe eines zweiten Antikörpers und eines Farbstoffes kann dann gebundenes Interferon- $\gamma$  am Boden der Platten in einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden.



Jede Interferon- $\gamma$  produzierende, also weitgehend *M. tuberculosis*-spezifische Zelle bildet einen Punkt am Boden der Mikrotiterplatte. Das Ergebnis wird in punktbildenden Zellen pro 250.000 mononukleären Zellen angegeben.

**Abbildung 2:** Verfahren des Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISPOT) zur Darstellung *M. tuberculosis*-spezifischer punktbildender Zellen (Quelle: AID, Strassberg).



Eine alternative Methode wird im *Enzyme-linked Immuno-sorbent Assay* (ELISA) verwendet (51). Venöses Blut wird mit *M. tuberculosis*-spezifischen Antigenen sowie eine unstimulierte Negativkontrolle ohne Antigen inkubiert. Anschließend wird statt der Anzahl der *M. tuberculosis*-spezifischen Zellen die Menge an produziertem Interferon- $\gamma$  durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 420 nm im Photometer bestimmt.

Für beide Testverfahren sind inzwischen zugelassene Testkits erhältlich, am weitesten verbreitet sind für das ELISPOT-Verfahren der *T-SPOT.TB* (Oxford Immunotec; Oxford, Großbritannien) und für das ELISA-Verfahren der *QuantiFERON-TB Gold In-Tube* (Cellestis; Carnegie, Australien). Die beiden Testverfahren haben einige Gemeinsamkeiten, so müssen beispielsweise die Blutproben wegen sonst verringerter Aktivität der T-Zellen in beiden Fällen innerhalb von 12 Stunden verarbeitet werden, und beide Tests liefern schon am nächsten Tag Ergebnisse. Im Unterschied zum ELISA ist das ELISPOT-Verfahren wegen der notwendigen Zellseparation technisch anspruchsvoller. Allerdings ist so eine definierte Anzahl von Zellen in der Probe gewährleistet, was z.B. bei Patienten mit zellulären Immundefekten von entscheidender Bedeutung ist (52, 53).

Wie eine aktuelle Meta-Analyse von Diel et al. (54) aus dem Jahr 2010 zeigt, ist der positive prädiktive Wert der Interferon- $\gamma$  release assays für die Entwicklung einer aktiven Tuberkulose dem des Tuberkulin-Hauttests möglicherweise überlegen.

Die meisten Personen, die an einer aktiven Tuberkulose erkranken, erkranken innerhalb der ersten 2 Jahre nach der Infektion. Eine Differenzierung von kürzlich Infizierten gegenüber solchen, bei denen die Infektion längere Zeit zurückliegt, ist also klinisch bedeutsam: Erst kürzlich Infizierte profitieren in weitaus größerem Maße von einer präventiven antituberkulösen Therapie als bereits seit längerem infizierte Personen (36).

Da in der Diagnostik der LTBI bisher kein Testverfahren zuverlässig in der Lage ist, eine frische von einer länger zurückliegenden Infektion zu unterscheiden, wird seit einigen Jahren verstärkt nach zusätzlichen diagnostischen Möglichkeiten gesucht. Ein möglicher Ansatz ist, diese zusätzlichen Informationen zum Krankheitsverlauf durch Kombination verschiedener ELISPOT-Verfahren zu erlangen, in denen also

neben der Interferon- $\gamma$ -Produktion noch die Sekretion weiterer Mediatoren untersucht wird. Möglicherweise könnte z.B. die gleichzeitige Messung der IL-2-Sekretion helfen, vor kurzem erfolgte von länger zurückliegenden *M. tuberculosis*-Infektionen zu unterscheiden.

In einer britischen Studie von 2007 wurde die Sekretion sowohl von IFN- $\gamma$  als auch von Interleukin-2 (IL-2) durch *M. tuberculosis*-Antigen-spezifische T-Zellen im Krankheitsverlauf der behandlungsbedürftigen Tuberkulose untersucht (55). Bei 23 Patienten wurde die Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 zunächst vor Behandlungsbeginn – also bei hoher *M. tuberculosis*-Antigenlast – und anschließend nach Therapieabschluss und damit niedrigerer Antigenlast gemessen. Während die IFN- $\gamma$ -Sekretion im Verlauf sank, stieg die IL-2-Sekretion unter Behandlung an (55). Die gleichzeitige Messung von IFN- $\gamma$ - und IL-2-Sekretion auf Einzelzell-Ebene ergab, dass zunächst Zellen vorherrschten, die ausschließlich IFN- $\gamma$  oder beide Mediatoren sezernierten, während unter und nach Abschluss der antituberkulösen Therapie eher Zellen nachgewiesen wurden, die entweder beide Mediatoren oder ausschließlich IL-2 sezernierten.

Vincenti et al. (56) fanden, dass einige Subtypen von T-Gedächtniszellen, die eher IL-2 als IFN- $\gamma$  sezernieren, nach erfolgreicher Tuberkulose-Behandlung eher persistieren.

Diese Ergebnisse ließen hoffen, dass auch in der Diagnostik der LTBI durch die Verwendung eines IL-2 ELISPOT zusätzliche Informationen zum Zeitpunkt der Infektion gewonnen werden könnten.

### **1.5 Ein Lehrer mit ansteckender Lungentuberkulose (Indexfall)**

Im Oktober 2007 wurde in die Medizinische Klinik des Forschungszentrums Borstel in Schleswig-Holstein ein 28-jähriger Lehrer aus Lübeck eingewiesen. Er klagte über zunehmenden Husten, allgemeines Schwächegefühl und Gewichtsverlust. Der wenig produktive Husten war zum ersten Mal im März 2007 aufgetreten und seitdem progredient, in diesem Zeitraum hatte sich auch der Allgemeinzustand des Mannes zunehmend verschlechtert. Unter mehrfacher antibiotischer Therapie war es zu

keiner Besserung der Symptomatik gekommen. Schließlich erfolgte im Oktober 2007 die stationäre Einweisung mit dem Verdacht auf Lungentuberkulose.

In der Röntgen-Thorax-Aufnahme sowie in der Computertomografie des Thorax fanden sich Tuberkulose-verdächtige Veränderungen. In der Mikroskopie des nach Ziehl-Neelsen gefärbten Sputums gelang der Nachweis säurefester Stäbchen.

Der junge Mann war an zwei Lübecker Schulen als Lehrer tätig, war aktiv in einer Kirchengemeinde und außerdem Sänger in einer Kirchenband. Es musste angenommen werden, dass er über einen Zeitraum von sieben Monaten infektiös gewesen war. Durch das Gesundheitsamt der Stadt Lübeck wurde eine Umgebungsuntersuchung eingeleitet.

### **1.6 Fragestellung und Zielsetzung**

Die oben beschriebene Situation mit dem erwähnten Lehrer als Indexfall war besonders geeignet, ein neues Testverfahren in der Diagnostik der LTBI zu untersuchen, weil hier eine außergewöhnlich große Gruppe von Kontaktpersonen mit definierter bzw. leicht zu ermittelnder Exposition zur Verfügung stand.

Durch die Firma AID (Advanced Imaging Devices, Strassberg) war ein Prototyp des IL-2-ELISPOT-Verfahrens entwickelt worden, der der Forschungsgruppe Klinische Infektiologie am Forschungszentrum Borstel für diese Studie zur Verfügung gestellt wurde.

In Zusammenarbeit mit dem Gesundheitsamt der Stadt Lübeck wurden die Kontaktpersonen identifiziert und zusätzlich zu der gesetzlich vorgeschriebenen Untersuchung mit dem THT bzw. dem IFN- $\gamma$  ELISPOT mit dem IL-2 ELISPOT getestet.

Folgende Fragestellungen sollten untersucht werden:

1. Ist die Expositionsdauer (als Maß für die Wahrscheinlichkeit einer Infektion) enger mit dem Ergebnis des THT, des IFN- $\gamma$  ELISPOT oder des IL-2 ELISPOT assoziiert?

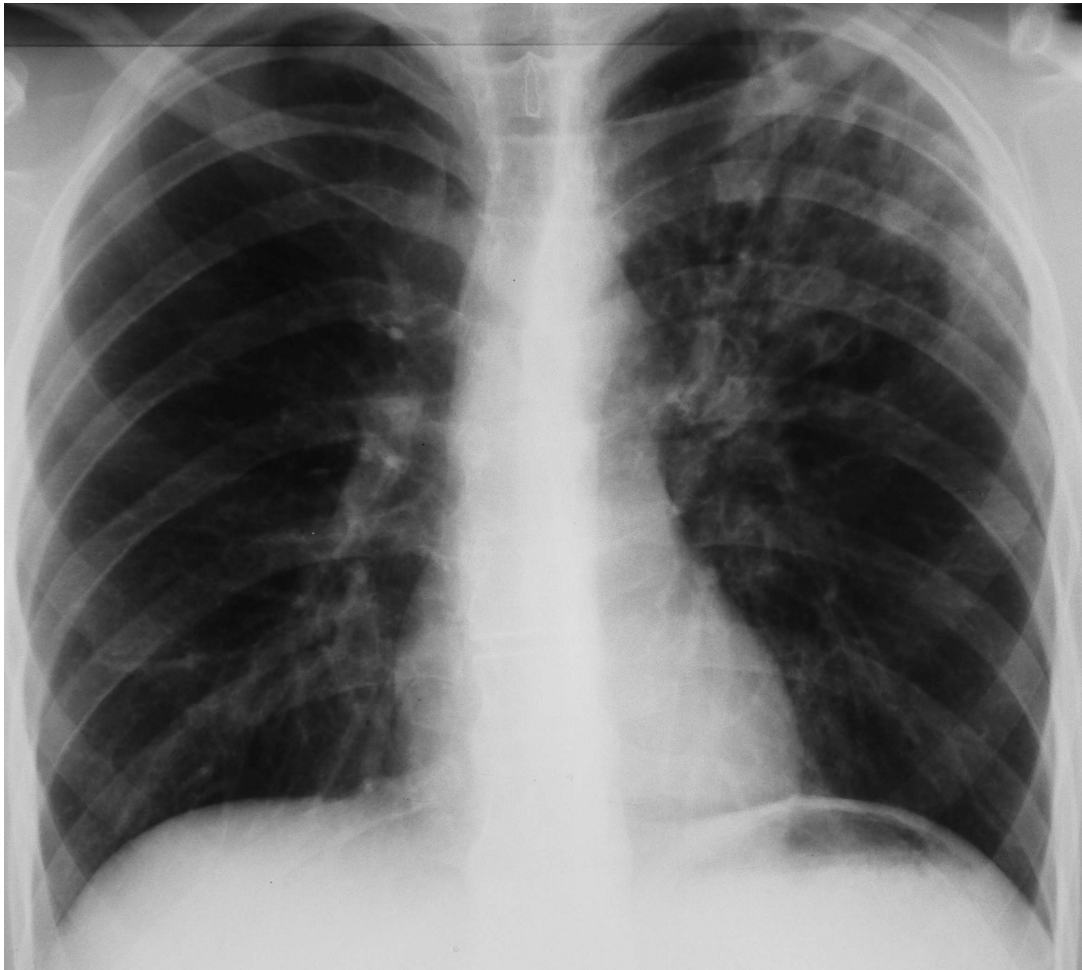
2. Sind die Testergebnisse des THT, des IFN- $\gamma$  ELISPOT oder des IL-2 ELISPOT durch die BCG-Impfung beeinflusst?
3. Erhöht die Kombination des IFN- $\gamma$  ELISPOT mit einem zweiten ELISPOT-Verfahren – dem IL-2 ELISPOT – die Genauigkeit für die Diagnose der LTBI?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Indexfall und Kontaktpersonen

Bei der Indexperson handelte es sich um einen 28-jährigen Lehrer aus Lübeck, der über einen Zeitraum von März bis Oktober 2007 unter zunehmendem produktivem Husten, allgemeinem Schwächegefühl und Gewichtsverlust litt. Er hatte zwischen März und Oktober sieben verschiedene Ärzte konsultiert und war zwischenzeitlich unter der Verdachtsdiagnose einer Pneumonie mit verschiedenen Antibiotika behandelt worden, worunter es jedoch zu keiner Besserung der Symptomatik kam. Eine Röntgenaufnahme des Thorax war ambulant zunächst nicht angefertigt worden. Im Oktober 2007 erfolgte schließlich die Einweisung in die Medizinische Klinik Borstel mit dem Verdacht auf Lungentuberkulose. Der Patient war in Deutschland geboren und aufgewachsen und bisher gesund gewesen. Er war nicht ins Ausland gereist und konnte keinen Kontakt zu Tuberkulose angeben. Eine HIV-Infektion bestand nicht.

Die am Tag der stationären Aufnahme angefertigte Röntgen-Aufnahme des Thorax ist in **Abbildung 3** wiedergegeben. In der Computertomografie des Thorax fanden sich große Einschmelzungen im linken apikalen Oberlappen mit angrenzenden teilweise soliden, teilweise fleckigen Infiltraten, außerdem vergrößerte Lymphknoten perihilär links sowie paramediastinal links.



**Abbildung 3:** Röntgen-Thorax-Aufnahme des Indexpatienten (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. med. W. Lotz, Abteilung für diagnostische Radiologie, Medizinische Klinik Borstel).

In der Mikroskopie des nach Ziehl-Neelsen gefärbten Sputums fanden sich säurefeste Stäbchen. In der Kultur konnte *M. tuberculosis* nachgewiesen werden, im Resistogramm zeigten sich Resistenzen gegenüber Isoniazid und Streptomycin. Unter der eingeleiteten Therapie mit Rifampizin, Pyrazinamid und Ethambutol zeigten sich zunächst weiterhin säurefeste Stäbchen im Sputum. Aus dem Sputum gelang mehrfach der kulturelle Nachweis von *M. tuberculosis*. Nach 46 Tagen unter Therapie kam es zu einer Sputumkonversion.

Es musste angenommen werden, dass der Patient von März bis Oktober 2007, also über einen Zeitraum von sieben Monaten, infektiös gewesen war. Durch das Gesundheitsamt Lübeck wurde eine Umgebungsuntersuchung eingeleitet.

In eine solche Umgebungsuntersuchung werden diejenigen Personen einbezogen, die während des infektiösen Stadiums einen engen Kontakt zum Indexfall hatten,

z.B. indem sie mit dem Indexfall insgesamt mindestens acht Stunden in geschlossenen Räumen oder Verkehrsmitteln verbracht haben (39). (Dieser Grenzwert gilt für den Fall des mikroskopischen Nachweises säurefester Stäbchen im Sputum des Indexpatienten, bei Sputum-negativen Indexpatienten gilt ein Grenzwert von 40 Stunden (39).)

Die im Rahmen der Umgebungsuntersuchung identifizierten Kontaktpersonen der Indexperson mit Sputum- und Kultur-positiver Lungentuberkulose waren in unterschiedlicher Weise exponiert gewesen: Neben Schülern und Kollegen des Indexpatienten, der an einer Grund- und einer Gesamtschule in Lübeck unterrichtet hatte, wurden auch Mitglieder seiner Kirchengemeinde, Musiker seiner Kirchenband, sein Gitarrenschüler sowie Freunde und Familienmitglieder untersucht. Die **Abbildungen 4-6** zeigen die betroffenen Schulen sowie die Umgebungsuntersuchung in einer der Schulen.



**Abbildung 4:** Luftaufnahme der beiden Schulen in Lübeck-Schlutup (Quelle: Google Earth).





**Abbildung 5:** Außenansicht eines der Schulgebäude.



**Abbildung 6:** Umgebungsuntersuchung in einer der beiden Lübecker Schulen.



Von den Kontaktpersonen wurden mittels eines Fragebogens (siehe **Anhang**) epidemiologische Daten erhoben. Gefragt wurde zunächst nach Ereignissen wie einer vorausgegangenen BCG-Impfung, wissentlichem Kontakt zu anderen Menschen mit ansteckender Lungentuberkulose, sowie nach in den letzten 12 Monaten durchgeführter Diagnostik (Röntgenbild des Thorax, THT) und medikamentöser Therapie einer Tuberkulose.

Die Kontaktpersonen wurden dann gebeten, die Dauer des Kontakts zur Indexperson während der vermuteten infektiösen Phase in Stunden pro Woche anzugeben. Als infektiöser Zeitraum wurde dabei die Zeit vom ersten Arztbesuch des Indexpatienten wegen Hustens bis zu seiner Aufnahme ins Krankenhaus angenommen (Anfang März bis Ende Oktober 2007, insgesamt 33 Wochen). Abschließend wurde nach bestehenden Erkrankungen und Medikamenteneinnahme gefragt.

In Zusammenarbeit mit dem Gesundheitsamt der Stadt Lübeck wurde bei den Kontaktpersonen ein Hauttest angelegt und/oder eine Blutentnahme zur ELISPOT-Testung vorgenommen. Die Durchführung des THT erfolgte 3-4 Wochen nach Aufnahme des Indexpatienten ins Krankenhaus. In allen Fällen, in denen die Studienteilnehmer (bzw. bei minderjährigen Schülern die Erziehungsberechtigten) der Blutentnahme zugestimmt hatten, wurde eine solche durchgeführt. Minderjährige wurden nur dann in die Studie eingeschlossen, wenn beide Erziehungsberechtigte dem zugestimmt hatten, Schulkinder ab sechs Jahren mussten außerdem selbst eingewilligt haben. Den Testungen waren zwei Informationsveranstaltungen für Schüler und ihre Eltern vorangegangen. Die Studie erhielt in einem Eilverfahren die Zustimmung der Ethikkommission der Universität zu Lübeck.

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

Die Hauttestung erfolgte nach der von Mendel und Mantoux 1908 bzw. 1910 beschriebenen Methode (30, 31). An der unbehaarten Beugeseite des Unterarms wurden 2TU/1ml des Tuberkulin RT23 SSI (Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark) intrakutan injiziert. Das Ablesen des Tests erfolgte nach 72 Stunden durch Ausmessen der Induration quer zur Unterarmachse mit der sog. Kugelschreiber-methode (35). Ein Indurationsdurchmesser von  $\geq 5$ mm gilt nach den

Empfehlungen des Deutschen Zentralkomitees zur Bekämpfung der Tuberkulose als positives Ergebnis (37).

### **2.3 Interferon- $\gamma$ Enzyme-linked Immunospot (IFN- $\gamma$ ELISPOT)**

Die ELISPOT-Analysen zur Bestimmung humanen IFN- $\gamma$  wurden gemäß den Angaben des Herstellers (Advanced Imaging Devices GmbH [AID], Strassberg) durchgeführt. Periphere mononukleäre Zellen (PBMC) wurden aus heparinisiertem Blut der Probanden isoliert und mit Hilfe von Ficoll-Hypaque-Dichte-Gradient-Zentrifugation von den übrigen Zellen getrennt. Die Zellen wurden in einem RPMI-1640-Medium mit 100 U/ml Penicillin, 100  $\mu$ g Streptomycin, 2 mmol/l L-Glutamin und 5%-FCS-Kultur kultiviert. 250.000 PBMCs wurden über Nacht auf 96-Näpfchen-Mikrotiterplatten, die mit einem Maus-Antikörper gegen humanes Interferon- $\gamma$  präpariert waren, in 200  $\mu$ l Kulturmedium inkubiert. Die Zellen wurden für die Negativ-Kontrolle unstimuliert belassen und für die Positiv-Kontrolle mit 10  $\mu$ g/ml PPD (purified protein derivate of tuberculin; Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark) stimuliert.

Anschließend wurden 5  $\mu$ g/ml des *M. tuberculosis*-Antigens hinzugefügt. Als Antigene wurden die RD1-kodierten Antigene CFP-10 (Rv3874) und ESAT-6 (Rv3875) (beide AID, Strassberg) verwendet. Nachdem die Proben für 20 Stunden bei 37°C kultiviert worden waren, wurden sie gewaschen und nach Zugabe eines monoklonalen Maus-Antikörpers gegen humanes IFN- $\gamma$  für weitere zweieinhalb Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Die gewaschenen Platten wurden dann für zwei Stunden mit Streptavidin-konjugierter Meerrettich-Peroxidase inkubiert und erneut gewaschen. Anschließend wurde ein Substratpuffer (3-Amino-9-Ethylcarbazol und Wasserstoffperoxid) 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).

Der Nachweis von mehr als fünf Punkt-bildenden, also IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen wurde als positiver Befund gewertet, wenn sich gleichzeitig mindestens doppelt so

viele IFN- $\gamma$  produzierende Zellen in der stimulierten Kultur befanden wie in der unstimulierten Kontrolle.

#### **2.4 Interleukin-2 Enzyme-linked Immunospot (IL-2 ELISPOT)**

Neben der IFN- $\gamma$ -Produktion wurde anschließend auch die IL-2-Produktion der T-Zellen nach Stimulation durch die Antigene CFP-10 und ESAT-6 untersucht. Das IL-2 ELISPOT-Verfahren wurde dabei analog zum IFN- $\gamma$  ELISPOT durchgeführt, wobei folgende Unterschiede gelten:

Die Membran der MAIPS4510-Mikrotiterplatten (Millipore GmbH, Schwalbach) wurde zunächst bei Raumtemperatur für zwei Minuten mit 50  $\mu$ l einer 70%igen Ethanol-Lösung angefeuchtet und anschließend fünfmal mit 200 ml Aqua bidest. gewaschen, um eine bessere Haftung der Antikörper an der Membran zu gewährleisten. Nach Beschichtung mit 10  $\mu$ g/ml anti-IL-2-Antikörpern (Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden) wurden die Platten über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Mikrotiterplatten wurden nun fünfmal mit 200 ml sterilem PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) gewaschen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit R10-Medium geblockt. Nach 18 Stunden Inkubation mit dem jeweiligen Antigen (CFP-10 oder ESAT-6) wurden die Platten bei Raumtemperatur mit 1  $\mu$ g/ml Biotin-konjugierten anti-IL-2-Antikörpern (Mabtech AB) für zwei Stunden und anschließend für eine Stunde mit in PBS 1:1000 verdünntem Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat (Mabtech AB) inkubiert. Schließlich wurde als farbiges Substrat BCIP/NBT Plus (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat/Nitroblau-Tetrazolium, Moss Inc., Pasadena, USA) hinzugegeben. Die Zählung und Interpretation der punktbildenden Zellen erfolgte dann wie oben beschrieben.

#### **2.5 Untersuchung des beim Indexpatienten isolierten *M. tuberculosis*-Stammes**

Um mögliche Hinweise auf die Virulenz des beim Indexpatienten isolierten *M. tuberculosis*-Stammes und damit auf die Wahrscheinlichkeit weiterer Infektionen im Umfeld des Indexpatienten zu erhalten, erfolgten schließlich eingehendere Untersuchungen des isolierten Stammes.

Die Zuordnung des isolierten Stammes zu einem bereits bekannten, also sequenzierten Stamm geschieht durch die MIRU-VNTR-Analyse (Mycobacterial interspersed repetitive unit - variable number of tandem repeats). Kern der MIRU-VNTR-Analyse ist eine Referenzdatenbank, die speziell zur Klassifizierung von *M. tuberculosis*-Isolaten entwickelt wurde. Sie enthält Daten mehrerer hundert repräsentativer Stämme aus dem *M. tuberculosis*-Komplex, deren Genotyp mit verschiedenen modernen Typisierungsverfahren charakterisiert wurde. So ist durch den Vergleich des Isolats mit einem beschriebenen Stamm eine korrekte Zuordnung sichergestellt (57-60).

Ein Ansatz zur Beurteilung eines isolierten *M. tuberculosis*-Stamm bzw. der zellulären Immunantwort auf den Stamm *in vitro* ist es, menschliche Immunzellen mit dem zu untersuchenden *M. tuberculosis*-Stamm in Kontakt zu bringen und anschließend ihre Bildung von Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) zu messen. In dieser Studie wurden hierzu zwei Typen von Immunzellen verwendet, zum einen menschliche THP-1-Zellen, aus einer Leukämiezelllinie stammende klonale monozytäre Zellen, und zum anderen menschliche von Monozyten abstammende Makrophagen (engl.: Monocyte-derived macrophages, MDM). Diese beiden Zelltypen wurden zur Darstellung der zellulären Immunantwort auf einen bestimmten *M. tuberculosis*-Stamm jeweils mit beim Indexpatienten isolierten *M. tuberculosis*-Stamm und einem bekannten Laborstamm in Kontakt gebracht, anschließend wurde die jeweilige TNF- $\alpha$ -Bildung der Zellen bestimmt. Im Einzelnen erfolgte die Untersuchung wie folgt:

Menschliche THP-1-Zellen wurden mit 5 ng/ml Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) über 96 Stunden zur Differenzierung gebracht. Die Gewinnung der von Monozyten abstammenden Makrophagen (MDM) erfolgte nach Reiling (61). Der beim Indexpatienten isolierte MTB-Stamm 9729/07 und der Labor-Stamm H37Rv wurden bei 37°C auf Middlebrook-7H9-Medium mit Middlebrook-OADC-Zusatz (BD Biosciences GmbH, Heidelberg) bis zu einer optischen Dichte von 0,2-0,4 angezüchtet.

Die Kulturen wurden geerntet, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Zur experimentellen Infektion *in vitro* wurden die Proben dann in Kulturmedium verdünnt,

und die Lösung wurde sechs Mal durch eine 27-Gauge-Nadel gezogen, um eine ausreichende Feinverteilung der Mykobakterien zu gewährleisten.

Die THP-1-Zellen (300000/ml) sowie die MDM-Zellen (500000/ml) wurden anschließend in 500-µl-Kulturen für 4 Stunden mit oder ohne die *M. tuberculosis*-Stämme H37Rv und 9729/07 inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Lipopolysaccharid (LPS) von *Salmonella enterica*, Serotyp Friedenau H909, verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H. Brade, Forschungszentrum Borstel). Die Messung der TNF- $\alpha$ -Freisetzung erfolgte dann im ELISA-Verfahren entsprechend den Vorgaben des Herstellers (TNF Duoset, R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt).

## **2.6 Statistische Auswertung**

Die Datenauswertung erfolgte mit Stata 9.0 (StataCorp, Stata Statistical Software, College Station, Texas, USA).

Die kategorischen Daten wurden mit dem  $\chi^2$ -Test analysiert. Bei geringerem Stichprobenumfang, wenn Zellzahlen unter fünf erwartet wurden, wurde der Fisher-Exakt-Test verwendet (62, 63). Zur Auswertung von nicht normal verteilten Intervallvariablen wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test für ungepaarte Stichproben verwendet.

In der Diagnostik der LTBI gibt es – anders als bei der behandlungsbedürftigen Tuberkulose – bisher keinen „Goldstandard“. Jedoch war es in dieser Untersuchungssituation (z.B. durch die Verwendung von Stundenplänen) möglich, die ermittelten Kontaktpersonen nach ihrer Exposition zum Indexpatienten in Gruppen mit engem oder nur gelegentlichem Kontakt einzuteilen und mit der Expositionsdauer stand ein Maß für die Wahrscheinlichkeit einer LTBI zur Verfügung. Die Kontaktpersonen wurden aufgrund ihrer Exposition zum Indexfall in zwei Gruppen stratifiziert. Als gelegentlicher Kontakt galten dabei Expositionszeiten von weniger als 100 Stunden, enge Kontaktpersonen wurden definiert als Personen mit 100 Stunden oder mehr Exposition.

Zur Beurteilung von mit einem positiven Testergebnis verknüpften Kovariablen wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt.

Die Korrelation zwischen den Ergebnissen der THT- und der ELISPOT-Testungen wurde mit dem  $\kappa$ -Koeffizienten eingeschätzt. Dabei zeigten Werte unter 0,41 nur eine geringe, falls überhaupt vorhandene Korrelation. Werte zwischen 0,41 und 0,60 galten als deutliche,  $\kappa$ -Werte zwischen 0,61 und 0,80 als starke Korrelation, Werte ab 0,81 als fast vollständige Übereinstimmung (62, 63).

Die Tests wurden als zweiseitige Tests durchgeführt. Als signifikante Testergebnisse galten solche mit einem p-Wert von  $<0,05$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Exposition der Kontaktpersonen

Vom Gesundheitsamt wurden 274 Personen als Kontaktpersonen der Indexperson mit Sputum- und Kultur-positiver Lungentuberkulose identifiziert. Der Indexpatient arbeitete als Lehrer in zwei Schulen, in einer Schule unterrichtete er eine Schulklasse, in der anderen sechs Klassen. Insgesamt wurden 167 Schulkinder im Alter von acht bis 16 Jahren untersucht, außerdem in der einen Schule 44 Lehrer, Verwaltungs- und Reinigungskräfte, in der anderen Schule 22 Erwachsene. Der Lehrer war außerdem aktiv in einer Kirchengemeinde und Sänger in einer kirchlichen Musikgruppe. Es wurden 14 Mitglieder seiner Kirchengemeinde und seiner Band untersucht, dazu ein Schüler, dem der Indexpatient Gitarrenunterricht erteilt hatte. Ebenfalls in der Studie untersucht wurden 26 Familienmitglieder und Freunde.

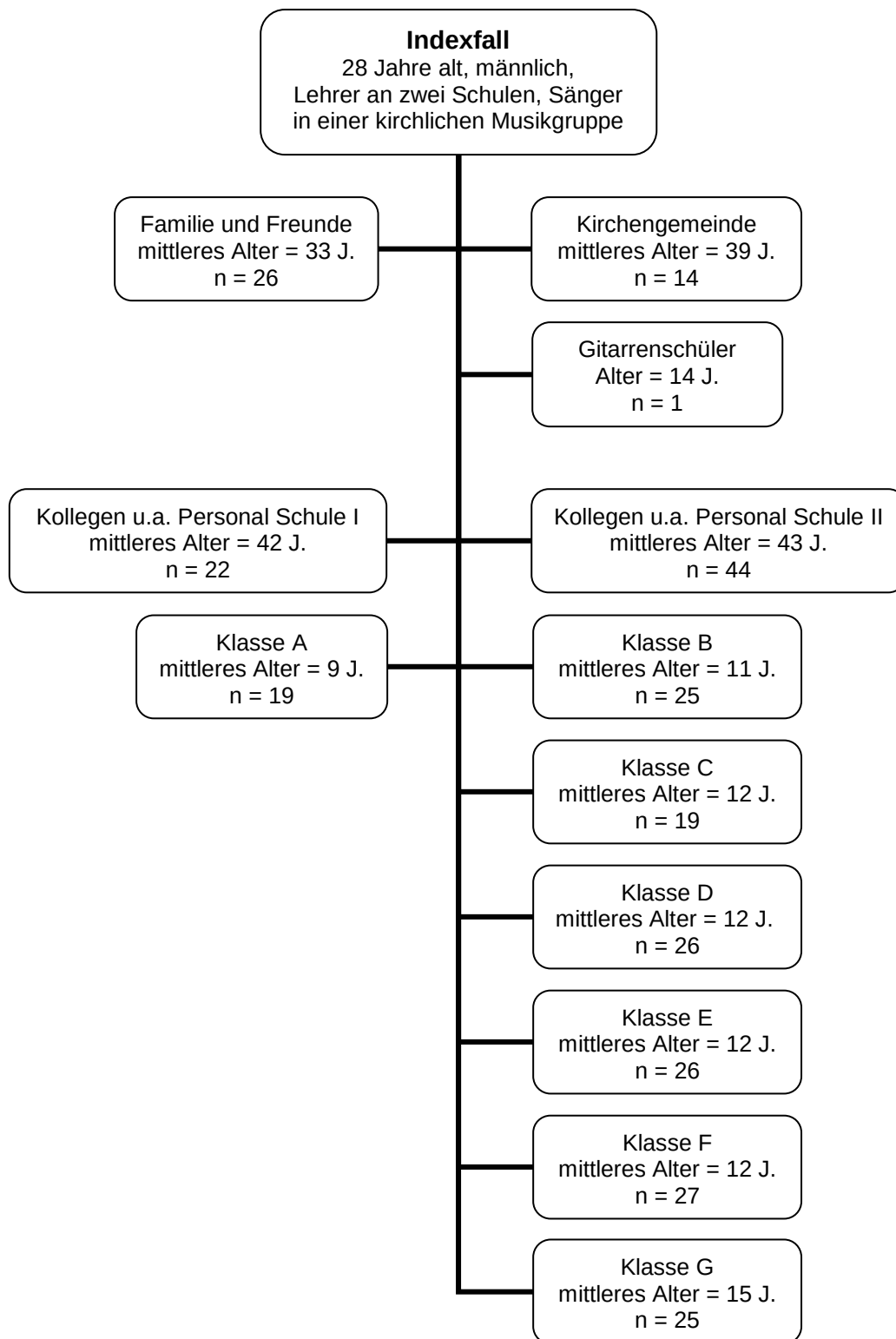
**Abbildung 7** zeigt die Beziehungen der Kontaktpersonen zum Indexfall.

Insgesamt wurden 172 Personen (62,7%) mit dem THT untersucht. Bei 167 Personen (60,9%) wurde ein Interferon- $\gamma$  ELISPOT-Test durchgeführt, bei 196 (71,5%) ein IL-2 ELISPOT. Die Verteilung der Testergebnisse ist in **Abbildung 8** dargestellt.

Vom Lübecker Gesundheitsamt wurde im Rahmen der gesetzlich vorgeschriebenen Umgebungsuntersuchung bei jeder Kontaktperson entweder die Anlage eines THT oder eine Blutentnahme zur Durchführung eines IFN- $\gamma$  ELISPOT gefordert. Im Rahmen der Studie wurde den Kontaktpersonen die Teilnahme an allen drei Testverfahren angeboten. Jedoch erteilten nicht alle Kontaktpersonen bzw. deren Eltern ihr Einverständnis zur parallelen Durchführung aller drei Verfahren (siehe **Abbildung 8**).

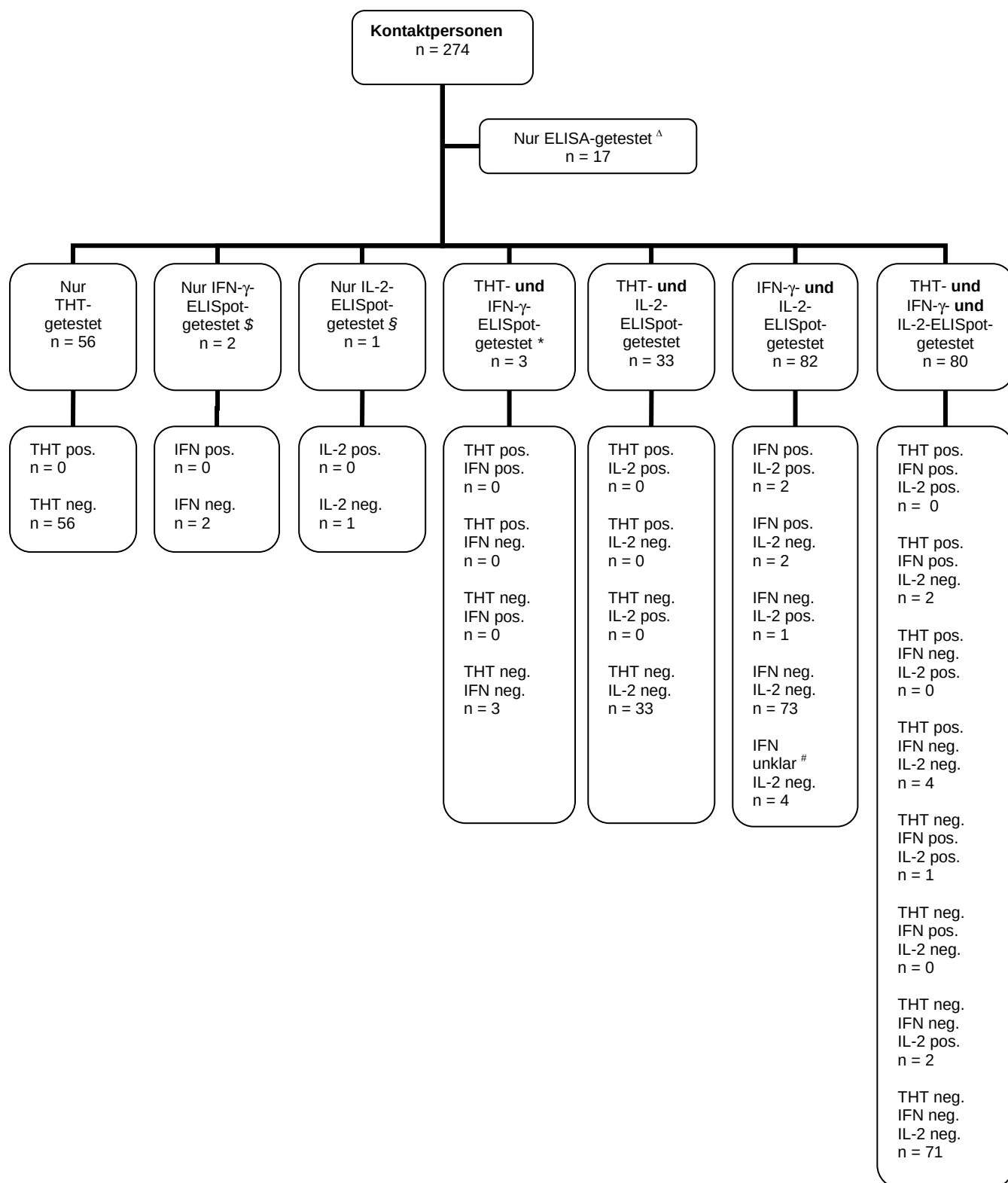
Bei Kontaktpersonen, bei denen kein THT durchgeführt werden kann oder dieser positiv ausfällt, verwendet das Gesundheitsamt in Lübeck in seinen Umgebungsuntersuchungen den Test *QuantiFERON-TB Gold In-Tube*. Siebzehn der vom Gesundheitsamt als Kontaktpersonen identifizierten Personen (6,2%) erhielten eine ELISA-Testung mit dem *QuantiFERON-TB Gold In-Tube*. Die mit dem ELISA getesteten Kontaktpersonen hatten einer Blutentnahme zur ELISPOT-Testung im Rahmen der Studie nicht zugestimmt, wurden aber bei fehlendem THT vom Gesundheitsamt zwangsweise mit dem ELISA getestet. In dieser

Umgebungsuntersuchung war in allen 17 Fällen eine bestehende Hauterkrankung, bei der der THT kontraindiziert ist, der Grund für die Verwendung des ELISA; in keinem der Fälle war zuvor ein positiver THT festgestellt worden. Die ELISA-Testergebnisse der 17 Personen wurden in der Studie nicht ausgewertet.



**Abbildung 7:** Beziehungen der 274 Kontaktpersonen zum Indexfall.





**Abbildung 8:** Verteilung der THT- und ELISPOT-Testergebnisse.

ELISA: Enzyme-linked immuno-sorbent assay; THT: Tuberkulin-Hauttest; IFN-γ: Interferon-γ; IL-2: Interleukin 2; ELISPOT: Enzyme-linked immuno-spot assay.

<sup>Δ</sup> In diesen Fällen war ein Hauttest (z.B. wegen Hauterkrankungen) nicht möglich. Diese Kontaktpersonen hatten einer Blutentnahme zur ELISPOT-Testung im Rahmen der Studie nicht zugestimmt, wurden aber bei fehlendem THT vom Gesundheitsamt mit dem ELISA (*QuantiFERON-TB Gold In-Tube*) getestet.

\$ Diese Kontaktpersonen erhielten keine IL-2 ELISPOT-Testung, weil ihre Zustimmung nur für bereits zugelassene Testmethoden vorlag. Es wurde daher ein IFN- $\gamma$  ELISPOT durchgeführt.

§ In diesem Fall war die abgenommene Blutmenge nicht ausreichend, um beide ELISPOT-Tests durchzuführen. Die Kontaktperson erhielt später eine ELISA-Testung durch das Gesundheitsamt, das Testergebnis war negativ.

\* Diese Kontaktpersonen erhielten keine IL-2 ELISPOT-Testung, weil ihre Zustimmung (bzw. die der Eltern) nur für bereits zugelassene Testmethoden vorlag.

# Diese vier Kontaktpersonen zeigten ein unklares Testergebnis im IFN- $\gamma$  ELISPOT. Weil kein Hauttest durchgeführt werden konnte, wurden diese Kontaktpersonen anschließend vom Gesundheitsamt mit dem ELISA getestet. Alle vier zeigten darin ein negatives Testergebnis.

### **3.2 Ergebnisse der Hauttests**

Sechs (3,4%) der 172 getesteten Kontaktpersonen wiesen beim THT einen Indurationsdurchmesser von  $\geq 5$  mm auf und präsentierten damit ein positives Testergebnis.

Achtzehn (10,5%) von 172 Personen waren BCG-geimpft, drei (16,7%) von ihnen zeigten eine positive Reaktion im Hauttest. 74 Studienteilnehmer gaben an, keine BCG-Impfung erhalten zu haben, einer (1,4%) von ihnen zeigte ein positives THT-Ergebnis. Leider konnten 80 Kontaktpersonen – die meisten von ihnen Schüler – ihren Impfstatus nicht angeben. Bei zwei (2,5%) von ihnen war die Hautreaktion im THT positiv.

### **3.3 Testergebnisse des Interferon- $\gamma$ ELISPOT**

Bei 167 (60,9%) der 274 Kontaktpersonen wurde eine Interferon- $\gamma$  ELISPOT-Testung durchgeführt. Sieben (4,2%) zeigten ein positives Ergebnis, 156 waren negativ. Vier (2,4%) der ELISPOT-Tests zeigten ein unklares Ergebnis, d.h., hier war die Positiv-Kontrolle nicht positiv oder die Negativ-Kontrolle nicht negativ. In allen vier Fällen war ein THT kontraindiziert, und durch das Gesundheitsamt wurden ELISA-Testungen veranlasst, von denen alle vier negativ ausfielen.

Alle sechs THT-positiven Studienteilnehmer erhielten auch einen IFN- $\gamma$  ELISPOT-Test. Von diesen waren zwei positiv und vier negativ. Von den 166 THT-negativen Personen wurden 77 (46,4%) mit dem IFN- $\gamma$  ELISPOT-Verfahren getestet, 1 (1,3%) zeigten hier ein positives Testergebnis, 76 (98,7%) waren negativ.

Allen Kontaktpersonen mit positivem THT- und/oder mit positivem IFN- $\gamma$  ELISPOT-Testergebnis wurde eine viermonatige Behandlung mit Rifampizin angeboten (37).

### 3.4 Testergebnisse des Interleukin-2 ELISPOT

Neben der Interferon- $\gamma$ -Produktion nach T-Zell-Stimulation mit den Antigenen CFP-10 und ESAT-6 wurde auch die Interleukin-2-Produktion der T-Zellen nach Stimulation durch diese beiden Antigene untersucht. Von 274 Kontaktpersonen wurden 196 (71,5%) mit dem IL-2 ELISPOT getestet. Sechs (3,1%) von ihnen zeigten dabei ein positives Ergebnis. Unter ihnen waren drei mit positiven sowie drei mit negativem IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnis. Drei der sechs Personen waren nicht mit dem Hauttest untersucht worden, die anderen drei waren hier negativ. Die Kontaktpersonen mit einem positiven Testergebnis in mindestens einem der drei Testverfahren sind in **Tabelle 1** dargestellt.

**Tabelle 1:** Kontaktpersonen mit positivem Testergebnis in mindestens einem der verwendeten Tests.

| Kontakt-person | Alter in Jahren | Ergebnis des THT | Ergebnis des IFN- $\gamma$ ELISPOT | Ergebnis des IL-2 ELISPOT | BCG-Impfung | vorheriger TB-Kontakt | Exposition in Stunden |
|----------------|-----------------|------------------|------------------------------------|---------------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|
| 1              | 35              | pos.             | neg.                               | neg.                      | ja          | nein                  | 60                    |
| 2              | 12              | pos.             | neg.                               | neg.                      | unbekannt   | nein                  | 56                    |
| 3              | 31              | pos.             | neg.                               | neg.                      | ja          | nein                  | 72                    |
| 4              | 39              | pos.             | neg.                               | neg.                      | nein        | nein                  | 12                    |
| 5              | 56              | pos.             | pos.                               | neg.                      | ja          | nein                  | 1000                  |
| 6              | 32              | pos.             | pos.                               | neg.                      | unbekannt   | ja                    | 136                   |
| 7              | 43              | nicht getestet   | pos.                               | neg.                      | nein        | nein                  | 130                   |
| 8              | 58              | nicht getestet   | pos.                               | neg.                      | ja          | nein                  | 1000                  |
| 9              | 51              | nicht getestet   | pos.                               | pos.                      | unbekannt   | ja                    | 24                    |
| 10             | 39              | nicht getestet   | pos.                               | pos.                      | ja          | nein                  | 130                   |
| 11             | 13              | neg.             | pos.                               | pos.                      | nein        | nein                  | 20                    |
| 12             | 15              | neg.             | neg.                               | pos.                      | nein        | nein                  | 32                    |
| 13             | 45              | neg.             | neg.                               | pos.                      | unbekannt   | nein                  | 48                    |
| 14             | 14              | nicht getestet   | neg.                               | pos.                      | nein        | nein                  | 32                    |

THT: Tuberkulin-Hauttest; ELISPOT: Enzyme-linked Immunospot Assay; IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$ ; IL-2: Interleukin 2; BCG: Bacille Calmette-Guérin.

In 34 Fällen reichte die abgenommene Menge der Blutprobe nicht zur Durchführung beider ELISPOTs aus. In diesen Fällen wurde nur die IL-2 ELISPOT-Testung durchgeführt. In 33 von 34 Fällen wurde außerdem ein THT angelegt, eine Kontaktperson wurde später durch das Gesundheitsamt mit dem ELISA-Verfahren (*QuantiFERON-TB Gold In-Tube*) getestet. Alle 34 Kontaktpersonen zeigten ein negatives Ergebnis sowohl im IL-2 ELISPOT als auch im THT bzw. im ELISA.

In fünf weiteren Fällen wurde nur der IFN- $\gamma$  ELISPOT ohne gleichzeitige Durchführung einer IL-2 ELISPOT-Testung durchgeführt. Bei dreien von ihnen wurde ein Hauttest angelegt. In diesen fünf Fällen hatten die Kontaktpersonen bzw. ihre Eltern nur der Durchführung eines bereits behördlich zugelassenen Testverfahrens zugestimmt. Alle fünf zeigten negative IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnisse, die drei Hauttests fielen negativ aus.

Unter den sechs Personen mit positivem IL-2 ELISPOT-Ergebnis gab eine Frau, eine 51jährige Gesamtschullehrerin, früheren Kontakt zu Tuberkulose an. Eine antituberkulöse Therapie war damals nicht erfolgt. Ihr IL-2 ELISPOT zeigte den höchsten Wert unter allen getesteten Kontaktpersonen, ihr IFN- $\gamma$  ELISPOT war ebenfalls positiv. Ein THT war aktuell nicht durchgeführt worden, jedoch hatte in der Vergangenheit eine Hauttestung ein deutlich positives Ergebnis gezeigt. Der Impfstatus der Frau war nicht bekannt. Die Dauer ihres Kontakts zum Indexpatienten wurde mit insgesamt 24 Stunden angegeben.

Unter den drei Kontaktpersonen mit positivem IL-2 ELISPOT- und negativem IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnis waren zwei Personen, eine Schülerin und eine Lehrerin, mit negativem Hauttest-Ergebnis. Die Schülerin war nicht BCG-geimpft, der Impfstatus der Lehrerin war nicht bekannt. Die Dauer des Kontakts zum Indexpatienten wurde mit insgesamt 32 bzw. 48 Stunden angegeben. Die dritte Kontaktperson, ein 14jähriger Junge, hatte keinen Hauttest erhalten. Er war nicht geimpft, seine Kontaktdauer betrug 32 Stunden.

### **3.5 Auswertung der Fragebögen**

Insgesamt wurden von 198 Kontaktpersonen (72,3%) Fragebögen ausgefüllt. Bei den Personen, die keinen Fragebogen ausgefüllt hatten, handelte es sich ausschließlich um Schüler, und die Expositionsdauer ließ sich in diesen Fällen aus den Angaben der Mitschüler derselben Klasse sowie den Stundenplänen rekonstruieren.

Nur drei der Studienteilnehmer berichteten über schwerere Erkrankungen oder immunsupprimierende Therapien. Ein Mann war an einem Kolonkarzinom erkrankt und hatte postoperativ eine Chemotherapie erhalten, die zwei Monate vor der

Umgebungsuntersuchung beendet worden war. Der IFN- $\gamma$  ELISPOT sowie der IL-2 ELISPOT des Patienten zeigten ein negatives Ergebnis, ein THT war nicht durchgeführt worden.

Ein Mädchen litt an einer chronischen Pankreatitis mit konsekutiver Pankreasinsuffizienz, die u.a. mit Insulin behandelt wurde. Der IFN- $\gamma$  ELISPOT und der IL-2 ELISPOT der Patientin waren negativ, ein THT war nicht angelegt worden.

Ein Mann war drei Wochen zuvor an einer Pneumonie erkrankt, im Röntgenbild fand sich ein Lingulainfiltrat. Er wurde mit Moxifloxacin behandelt. Der IFN- $\gamma$  ELISPOT-Test sowie der IL-2 ELISPOT des Patienten waren negativ, ein THT war nicht durchgeführt worden.

Elf der Kontaktpersonen litten an Asthma bronchiale, fünf von ihnen wurden mit inhalativen Kortikosteroiden therapiert, jedoch keiner mit oralen Kortikosteroiden. Andere immunsupprimierende Erkrankungen oder Therapien (HIV-Infektion, chronische Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus, maligne Erkrankungen, Chemotherapie, systemische Kortikosteroide, TNF-Antagonisten, Hämodialyse) oder Beschwerden wie chronischer Husten, Nachtschweiß oder Gewichtsverlust in den letzten sechs Monaten wurden von keinem weiteren Studienteilnehmer berichtet. Keiner der 198 Kontaktpersonen gab an, in den letzten 12 Monaten wegen einer Tuberkulose behandelt worden zu sein.

Zwölf (6,1%) Kontaktpersonen hatten früher schon einmal Kontakt zu Patienten mit einer Tuberkulose gehabt. Eine Chemoprophylaxe hatte keiner von ihnen erhalten. Zehn der zwölf Kontaktpersonen erhielten eine IFN- $\gamma$  ELISPOT-Testung, zwei Tests fielen dabei positiv aus. Elf von 12 wurden mit dem IL-2 ELISPOT getestet, ein Ergebnis war positiv. Unter 7 durchgeführten Hauttestungen war ein positives Ergebnis.

Ein 32 Jahre alter Mann mit unbekanntem Impfstatus zeigte ein positives THT- sowie ein positives IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnis bei negativem IL-2 ELISPOT. Seine Kontaktdauer zum Indexpatienten betrug insgesamt 136 Stunden.

Die oben erwähnte 51jährige Gesamtschullehrerin wies einen positiven IL-2 ELISPOT auf, ihr IFN- $\gamma$  ELISPOT Testergebnis war ebenfalls positiv. Ein THT war aktuell nicht durchgeführt worden, jedoch hatte in der Vergangenheit eine

Hauttestung ein deutlich positives Ergebnis gezeigt. Ihre Kontaktdauer betrug insgesamt 24 Stunden. Der Impfstatus der Frau war nicht bekannt.

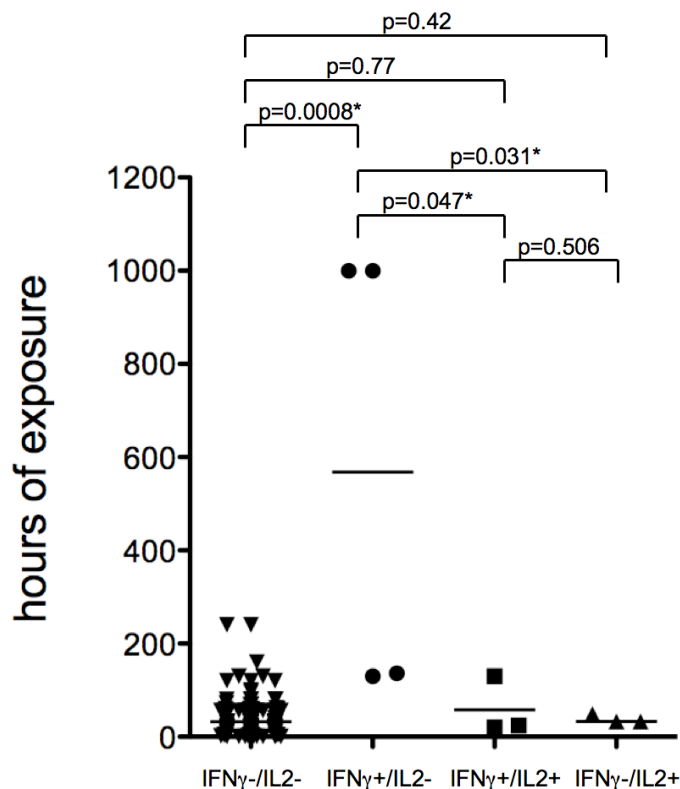
Ein 65-jähriger in Polen geborener Mann war im Alter von vier Jahren an einer Lungentuberkulose erkrankt. Der IFN- $\gamma$  ELISPOT sowie der IL-2 ELISPOT des Patienten zeigten ein negatives Ergebnis, ein THT war nicht durchgeführt worden.

### **3.6 Zusammenhang der Testergebnisse mit Expositionsdauer und BCG-Impfstatus**

Die mittlere Kontaktdauer zum Indexpatienten war unter den Kontaktpersonen mit positivem IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnis (130 Stunden, Interquartilsabstand [IQR] 24\_1000 Stunden) höher als unter den IL-2 ELISPOT-positiven (32 Stunden, IQR 24\_48 Stunden), allerdings war das Ergebnis statistisch nicht signifikant ( $p=0,15$ ). Für die Gruppe der THT-positiven Kontaktpersonen lag die mittlere Kontaktdauer zum Indexpatienten bei 66 Stunden (IQR 56\_136 Stunden).

Kein statistisch signifikanter Unterschied in den mittleren Kontaktzeiten fand sich im Vergleich der THT-positiven Kontaktpersonen zu den IFN- $\gamma$  ELISPOT-positiven ( $p=0,52$ ) oder zu den IL-2 ELISPOT-positiven Kontaktpersonen ( $p=0,15$ ).

Personen mit einem positiven IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnis und einem negativen im IL-2 ELISPOT hatten eine mittlere Kontaktdauer von 568 Stunden (IQR 133\_1000 Stunden). Im Vergleich dazu hatten Personen mit einem positiven IFN- $\gamma$  ELISPOT und einem positiven IL-2 ELISPOT eine mittlere Kontaktdauer von 24 Stunden (IQR 20\_130 Stunden;  $p=0,047$ ), Kontaktpersonen mit einem negativen IFN- $\gamma$  ELISPOT und einem positiven IL-2 ELISPOT zeigten eine mittlere Kontaktdauer zum Indexpatienten von 32 Stunden (IQR 32\_48 Stunden;  $p=0,031$ ), siehe **Abbildung 9**.



**Abbildung 9:** Ergebnisse des IFN- $\gamma$  ELISPOT sowie des IL-2 ELISPOT und die mittlere Expositionsdauer in vier Gruppen (IFN- $\gamma$  -/IL-2 -, IFN- $\gamma$  +/IL-2 -, IFN- $\gamma$  +/IL-2 +, IFN- $\gamma$  -/IL-2 +).

\*: Unterschiede statistisch signifikant.

In der Regressionsanalyse zeigten das Alter, das Geschlecht sowie der Impfstatus keinen Einfluss auf das Testergebnis im IFN- $\gamma$  ELISPOT, IL-2 ELISPOT oder THT.

Verglichen mit der Gruppe der Personen mit nur gelegentlichem Kontakt zum Indexfall (Expositionszeit < 100 Stunden) war das Risiko für ein positives IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnis 40,8-mal höher (95%-Konfidenzintervall 6,9-240,3;  $p < 0,001$ ) und das Risiko für ein positives THT-Ergebnis (Indurationsdurchmesser von  $\geq 5$ mm) 19,3-fach erhöht (95%-KI 2,7-137,5;  $p = 0,003$ ), wenn die Person engen Kontakt zum Indexfall gehabt hatte. Im Gegensatz zum IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnis war das THT-Ergebnis stärker durch eine vorausgegangene BCG-Impfung beeinflusst, allerdings war dieses Ergebnis nicht signifikant.

Das Risiko für ein positives IL-2 ELISPOT-Ergebnis war bei Personen mit engem Kontakt zum Indexfall 2,5-fach höher (95%-Konfidenzintervall 0,3-23,0;  $p < 0,001$ ) als bei Personen mit nur gelegentlichem Kontakt (**Tabelle 2**).

**Tabelle 2:** Odds Ratios für ein positives Ergebnis im IFN- $\gamma$  ELISPOT, IL-2 ELISPOT bzw. THT.

| Kovariablen             | IL-2 ELISPOT<br>Odds Ratio (95%-KI) | IFN- $\gamma$ ELISPOT<br>Odds Ratio (95%-KI) | Tuberkulin-Hauttest<br>Odds Ratio (95%-KI) |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Exposition $\geq$ 100 h | 2,5 (0,3 - 23,0) p<0,001            | 40,8 (6,9 - 240,3) p<0,001                   | 19,3 (2,7 - 137,5) p=0,003                 |
| BCG-Impfung             | 1,4 (0,5 - 3,4) p=0,51              | 1,7 (0,7 - 4,0) p=0,21                       | 2,3 (0,9 - 5,9) p=0,07                     |
| Alter                   | 1,02 (1,0 - 1,1) p=0,3              | 1,06 (1,0 - 1,1) p=0,008                     | 1,05 (1,0 - 1,1) p=0,02                    |
| Geschlecht (männlich)   | 0,8 (0,1 - 4,5) p=0,8               | 1,1 (0,2 - 5,1) p=0,9                        | 1,05 (0,3 - 2,5) p=0,29                    |

KI: Konfidenzintervall; BCG: Bacille Calmette-Guérin.

Die Übereinstimmung zwischen THT- und IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnissen sowie zwischen IFN- $\gamma$  ELISPOT und IL-2 ELISPOT war deutlich ( $\kappa=0,42$  bzw.  $\kappa=0,44$ ), die Übereinstimmung zwischen THT und IL-2 ELISPOT war gering ( $\kappa=-0,04$ ).

### 3.7 Genotypisierung des beim Indexpatienten isolierten *M. tuberculosis*-Stammes und Analyse der durch diesen Stamm induzierten TNF- $\alpha$ -Bildung *ex vivo*

Trotz der ausgeprägten klinischen Symptomatik des Indexpatienten, der retrospektiv über einen Zeitraum von sieben Monaten als infektiös anzusehen war und bei dem sowohl der mikroskopische als auch der kulturelle Nachweis von säurefesten Stäbchen im Sputum gelang, fanden sich bei den Kontaktpersonen nur wenige positive Ergebnisse in den drei durchgeführten immunologischen Tests. Um mögliche Hinweise auf die Virulenz des beim Indexpatienten isolierten *M. tuberculosis*-Stammes zu erhalten, erfolgten nun eingehendere Untersuchungen des isolierten Stammes.

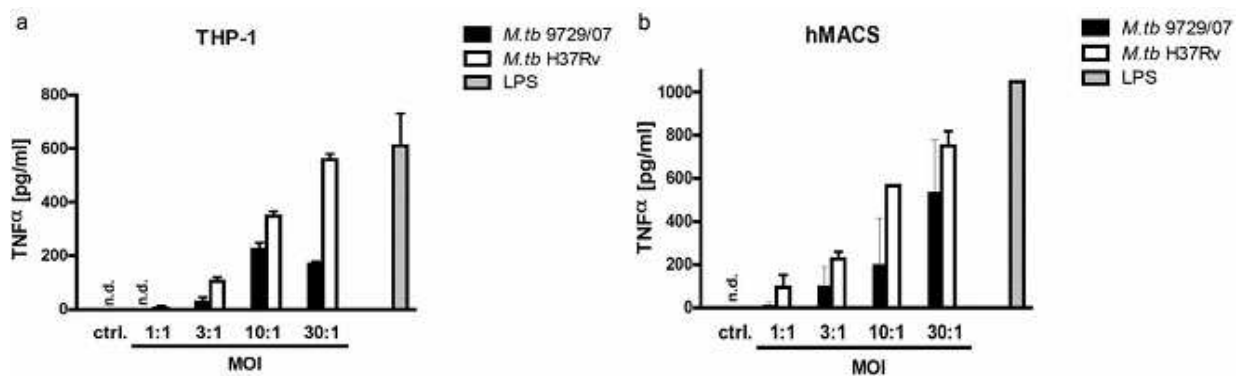
Die Genotypisierung des beim Indexpatienten isolierten *M. tuberculosis*-Stammes 9729/07 und des Labor-Stammes H37Rv erfolgte wie durch Wirth beschrieben (64). Die MIRU-VNTR-Analyse (Mycobacterial interspersed repetitive unit - variable number of tandem repeats) konnte den Stamm des Indexpatienten als ostafrikanisch-indischen Stamm identifizieren, während der Labor-Stamm als ein Haarlem-Subtyp klassifiziert wurde.

Zur Darstellung der zellulären Immunantwort auf den *M. tuberculosis*-Stamm des Indexpatienten wurden menschliche THP-1-Zellen sowie MDM-Zellen mit diesem



Stamm und einem Laborstamm in Kontakt gebracht und anschließend die jeweilige TNF- $\alpha$ -Bildung der Zellen untersucht.

*In vitro* zeigte der beim Indexpatienten isolierte *M. tuberculosis*-Stamm dabei eine schwächere Zellaktivierung: Im Vergleich zum Laborstamm H37Rv induzierte der Stamm 9729/07 in den THP-1- und MDM-Zellen eine um 30-50% geringere TNF- $\alpha$ -Bildung (siehe **Abbildung 10**).



**Abbildung 10:** TNF- $\alpha$ -Bildung durch menschliche THP-1-Zellen (a) sowie durch von Monozyten abstammende Makrophagen (b) nach Kontakt mit den *M. tuberculosis*-Stämmen 9729/07 und H37Rv (Laborstamm).

LPS: Lipopolysaccharide (Positivkontrolle), n.d.: nicht nachweisbar, ctrl.: Medium-Kontrolle, MOI: Multiplicity of infection.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Allgemeines**

Im Rahmen einer großen Tuberkulose-Umgebungsuntersuchung wurde in dieser Arbeit erstmals bei gesunden Kontaktpersonen eines Patienten mit ansteckungsfähiger Lungentuberkulose ein neues Testverfahren zur Unterscheidung von kürzlich erfolgten und länger zurückliegenden Infektionen mit den beiden etablierten Verfahren Tuberkulin-Hauttest und Interferon- $\gamma$  ELISPOT verglichen (65).

Die Kombination aus IFN- $\gamma$  ELISPOT und IL-2 ELISPOT erlaubte dabei eine signifikant bessere Unterscheidung zwischen kürzlich erfolgten und länger zurückliegenden Infektionen mit *M. tuberculosis* als der IFN- $\gamma$  ELISPOT oder der THT allein. Wenn sich die Ergebnisse dieser Feldstudie auch auf den positiven prädiktiven Wert der Testkombination niederschlagen, könnte dadurch die präventive Chemotherapie zur Verhinderung der aktiven Tuberkulose deutlich gezielter eingesetzt werden.

### **4.2 Grundsätzliches zu Umgebungsuntersuchungen**

Die Umgebungsuntersuchung stellt eine der einfachsten und effektivsten Interventionen zur Identifizierung von (vor kurzem) mit *M. tuberculosis* infizierten Personen und damit eine der wichtigsten Präventionsmaßnahmen dar. Sie ist insbesondere in Ländern mit niedriger Tuberkulose-Inzidenz eine der wichtigsten Maßnahmen zur Bekämpfung der Tuberkulose überhaupt (66).

Ziele der Umgebungsuntersuchung sind erstens die Reduktion von Tuberkulose-bedingter Morbidität und Mortalität durch frühzeitige Identifizierung und adäquate Behandlung von infizierten Kontaktpersonen und zweitens das Verhindern einer weiteren Ausbreitung durch zeitnahe Identifizierung von möglichen (sekundären) Infektionsquellen.

Zusätzlich zur Identifizierung von infizierten Kontaktpersonen ist vor allem in Ländern mit niedriger Tuberkulose-Inzidenz, in denen die vollständige Eradikation der Tuberkulose angestrebt wird, auch eine adäquate präventive Therapie oder zumindest ein adäquates Follow-up der Kontaktpersonen mit frischer LTBI wichtig, um zusätzliche Tuberkulosefälle im weiteren Verlauf zu verhindern. Bei

Kontaktpersonen mit LTBI ist also auch die Abschätzung ihres individuellen Risikos, im Verlauf an einer Tuberkulose zu erkranken, von großer Bedeutung (66).

#### **4.3 Sensitivität und Spezifität des THT**

Die Sensitivität ist der Anteil der erkrankten Personen, die ein positives Testergebnis aufweisen. Die Spezifität beschreibt den Anteil der gesunden (hier: der nicht mit *M. tuberculosis* infizierten bzw. an Tuberkulose erkrankten) Personen, die im verwendeten Test eine negative Testreaktion zeigen.

In der Diagnostik der LTBI gibt es – anders als bei der behandlungsbedürftigen Tuberkulose – bisher keinen „Goldstandard“. Die Sensitivität und Spezifität der hier verglichenen Testverfahren können also nicht direkt bestimmt werden (67). Allerdings ist eine Ansteckung und damit ein positives Testergebnis umso wahrscheinlicher, je länger und enger der Kontakt zu einem Erkrankten bestand; die Infektiosität von *M. tuberculosis* korreliert mit der Dauer des Kontakts zum Index-Fall (68-70). Ein Test, der sensitiver und spezifischer als der THT ist, sollte also besser mit der Expositionsdauer korrelieren und außerdem nicht durch eine vorangegangene BCG-Impfung beeinflusst werden (50).

Die Sensitivität des THT liegt laut Pai (71) in 20 untersuchten Studien mit insgesamt 1193 Teilnehmern bei 71-82%. Sie ist vermindert bei malignen Erkrankungen, bei zellulären Immundefekten wie z.B. einer HIV-Infektion (38), bei iatrogener Immunsuppression und bei akuten oder kurz zurückliegenden schweren Virusinfektionen (Influenza, Masern, Röteln und Windpocken). Ebenfalls falsch-negative THT-Ergebnisse finden sich bei fulminanter tuberkulöser Erkrankung (z.B. Miliartuberkulose) sowie bei Sarkoidose und bei älteren Menschen, außerdem bis zu 6 Wochen nach einer Lebendimpfung (33, 36). Die Spezifität des THT liegt laut Pai (71) bei nicht geimpften Personen (in 6 Studien mit 847 Teilnehmern) bei 95-99%. Bei BCG-geimpften ist sie deutlich niedriger und variiert stärker (46-73%).

Eine BCG-Impfung oder eine Infektion mit nichttuberkulösen Mykobakterien (NTM) können beim THT zu positiven Ergebnissen führen, also die Spezifität des Tests verringern (27, 32, 34, 36). 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 (34). Nur 8 Prozent der Personen, die zum Zeitpunkt ihrer Geburt eine BCG-Impfung erhielten, weisen 15 Jahre später noch einen positiven THT auf (28). Häufig liegen über die einzelnen Parameter leider keine genauen Informationen vor.

Eine Infektion mit nichttuberkulösen Mykobakterien mit dadurch verursachten Kreuzreaktionen kann eine weitere Erklärung für positive THT-Ergebnisse sein. Die Reaktion des THT auf NTM beruht ähnlich wie bei der BCG-Impfung auf dem Vorhandensein von Antigenen im Tuberkulin, die auch bei verschiedenen NTM vorkommen. Die RD1-Antigene werden, mit Ausnahme von *M. kansasii*, *M. marinum* und *M. szulgai*, von den meisten NTM nicht exprimiert (48). Allerdings wurde im Genom von *M. leprae* ein ESAT-6-homologes Antigen identifiziert (72). Etwa ein Fünftel der positiven THT-Ergebnisse bei BCG-ungeimpften, ELISPOT-negativen Probanden kann durch eine Infektion mit NTM bedingt sein (73).

#### **4.4 Sensitivität und Spezifität des IFN- $\gamma$ ELISPOT**

Mehrere Studien haben in den letzten Jahren die beiden Testverfahren THT und IFN- $\gamma$  ELISPOT in der Diagnostik der *M. tuberculosis*-Infektion verglichen. Eine Übersicht über die bisher veröffentlichten Studien gibt **Tabelle 3**.

**Tabelle 3:** Identifikation einer Infektion mit *M. tuberculosis* durch Interferon- $\gamma$  Release Assays (ELISA oder ELISPOT) bei Personen ohne aktive Tuberkulose.

| Studie                     | ELISA/<br>ELISPOT | n   | verwendete<br>Antigene | BCG-<br>geimpft | pos. Test-<br>ergebnis |
|----------------------------|-------------------|-----|------------------------|-----------------|------------------------|
| Ravn et al. 1999 (74)      | ELISA             | 30  | ESAT-6                 | 78%             | 47%                    |
| Ulrichs et al. 2000 (75)   | ELISPOT           | 12  | ESAT-6                 | 0%              | 83%                    |
| Vekemans et al. 2001 (76)  | ELISA             | 28  | ESAT-6                 | n.a.            | 71%                    |
| Arend et al. 2001 (77)     | ELISA             | 12  | ESAT-6, CFP-10         | n.a.            | 67%                    |
| Lalvani et al. 2001 (46)   | ELISPOT           | 26  | ESAT-6                 | n.a.            | 85%                    |
| Lalvani et al. 2001 (50)   | ELISPOT           | 50  | ESAT-6                 | 77%             | 39%                    |
| Pathan et al. 2001 (78)    | ELISPOT           | 27  | ESAT-6                 | 88%             | 85%                    |
| Ewer et al. 2003 (79)      | ELISPOT           | 535 | ESAT-6, CFP-10         | 87%             | 27%                    |
| Brock et al. 2004 (80)     | ELISA             | 125 | ESAT-6, CFP-10         | 32%             | 26%                    |
| Vekemans et al. 2004 (81)  | ELISA             | 44  | CFP-10                 | n.a.            | 95%                    |
| Richeldi et al. 2004 (82)  | ELISPOT           | 92  | ESAT-6, CFP-10         | 10%             | 18%                    |
| Shams et al. 2005 (83)     | ELISPOT           | 413 | ESAT-6, CFP-10         | 49%             | 39%                    |
| Zellweger et al. 2005 (84) | ELISPOT           | 91  | ESAT-6, CFP-10         | 86%             | 15%                    |
| Kang et al. 2005 (85)      | ELISA             | 48  | ESAT-6, CFP-10         | 67%             | 44%                    |
| Diel et al. 2006 (86)      | ELISA             | 309 | ESAT-6, CFP-10         | 51%             | 10%                    |
| Diel et al. 2006 (87, 88)  | ELISPOT           | 83  | ESAT-6, CFP-10         | 57%             | 16%                    |
| Kobashi et al. 2007 (89)   | ELISA             | 190 | ESAT-6, CFP-10         | 78%             | 3%                     |
| Hill et al. 2007 (90)      | ELISPOT           | 558 | ESAT-6, CFP-10         | n.a.            | 40%                    |
| Arend et al. 2007 (91)     | ELISA             | 785 | ESAT-6, CFP-10         | 0%              | 10%                    |
| Arend et al. 2007 (91)     | ELISPOT           | 759 | ESAT-6, CFP-10         | 0%              | 19%                    |
| Goletti et al. 2008 (92)   | ELISA             | 97  | ESAT-6, CFP-10         | 27%             | 38%                    |
| Goletti et al. 2008 (92)   | ELISPOT           | 97  | ESAT-6, CFP-10         | 27%             | 55%                    |

ELISA: Enzyme-linked immuno-sorbent assay; ELISPOT: Enzyme-linked immunospot assay; ESAT-6: Early secretory antigenic target 6; CFP-10: Culture filtrate protein 10; BCG: Bacille Calmette-Guérin; n.a.: nicht angegeben.

Bei der aktiven Tuberkulose liegt die Sensitivität des IFN- $\gamma$ -ELISPOT-Verfahrens bei 81-100%, die Spezifität bei 44-100% (s. **Tabelle 4**).

**Tabelle 4:** Sensitivität und Spezifität des Interferon- $\gamma$  Enzyme-linked Immunospot Assay bei Personen mit aktiver Tuberkulose.

| Studie                        | n   | verwendete<br>Antigene | BCG-<br>geimpft | Sensitivität | Spezifität |
|-------------------------------|-----|------------------------|-----------------|--------------|------------|
| Lalvani et al. 2001 (46)      | 47  | ESAT-6                 | 77%             | 96%          | 100%       |
| Pathan et al. 2001 (80)       | 33  | ESAT-6                 | n.a.            | 91%          | 100%       |
| Chapman et al. 2002 (47)      | 11  | ESAT-6, CFP-10         | n.a.            | 100%         | 100%       |
| Liebeschuetz et al. 2004 (93) | 57  | ESAT-6, CFP-10         | 95%             | 81%          | n.a.       |
| Kang et al. 2005 (85)         | 54  | ESAT-6, CFP-10         | 56%             | 81%          | n.a.       |
| Meier et al. 2005 (94)        | 72  | ESAT-6, CFP-10         | n.a.            | 97%          | 92%        |
| Lee et al. 2006 (95)          | 87  | ESAT-6, CFP-10         | 52%             | 97%          | 85%        |
| Goletti et al. 2006 (96)      | 23  | ESAT-6, CFP-10         | n.a.            | 91%          | 59%        |
| Ferrara et al. 2006 (97)      | 24  | ESAT-6, CFP-10         | 18%             | 83%          | n.a.       |
| Kang et al. 2007 (98)         | 64  | ESAT-6, CFP-10         | 36%             | 92%          | 47%        |
| Janssens et al. 2007 (99)     | 58  | ESAT-6, CFP-10         | 82%             | 83%          | 74%        |
| Detjen et al. 2007 (100)      | 28  | ESAT-6, CFP-10         | 14%             | 93%          | 100%       |
| Dominguez et al. 2008 (101)   | 42  | ESAT-6, CFP-10         | 24%             | 86%          | n.a.       |
| Soysal et al. 2008 (102)      | 100 | ESAT-6, CFP-10         | n.a.            | 84%          | 85%        |
| Dosanjh et al. 2008 (103)     | 148 | ESAT-6, CFP-10         | 60%             | 86%          | 72%        |
| Goletti et al. 2008 (92)      | 97  | ESAT-6, CFP-10         | 27%             | 85%          | 44%        |

ESAT-6: Early secretory antigenic target 6; CFP-10: Culture filtrate protein 10; BCG: Bacille Calmette-Guérin; n.a.: nicht angegeben.

In der Diagnostik der LTBI gibt es – anders als bei der behandlungsbedürftigen Tuberkulose – bisher keinen „Goldstandard“. Deshalb verwenden einige Autoren die Exposition als Maß für die Wahrscheinlichkeit einer LTBI. **Tabelle 5** zeigt die Ergebnisse dieser Studien.

**Tabelle 5:** Ergebnisse des Interferon- $\gamma$  Enzyme-linked Immunospot Assay (IFN- $\gamma$  ELISPOT) und des Tuberkulin-Hauttests (THT) in Personengruppen mit unterschiedlich intensiver Exposition.

| Studie                                        | intensive Exposition |                       |                      | mittlere Exposition |                       |                      | geringe Exposition |                       |                      |
|-----------------------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|
|                                               | n                    | ELISPOT-<br>pos. in % | THT-<br>pos.<br>in % | n                   | ELISPOT-<br>pos. in % | THT-<br>pos.<br>in % | n                  | ELISPOT-<br>pos. in % | THT-<br>pos.<br>in % |
| <b>Lalvani et al. 2001<sup>Δ</sup></b> (50)   | 20                   | 73                    | 65                   | 8                   | 38                    | 43                   | 12                 | 0                     | 31                   |
| <b>Ewer et al. 2003<sup>§</sup></b> (79)      | 20                   | 100                   | 90                   | 81                  | 53                    | 51                   | 47                 | 38                    | 40                   |
| <b>Richeldi et al. 2004<sup>§</sup></b> (82)  | 4                    | 25                    | 0                    | 9                   | 67                    | 11                   | 16                 | 6                     | 6                    |
| <b>Hill et al. 2004<sup>*</sup></b> (104)     | 149                  | 38                    | 62                   | 340                 | 30                    | 41                   | 246                | 24                    | 28                   |
| <b>Zellweger et al. 2005<sup>#</sup></b> (84) | 54                   | 22                    | 50                   | -                   | -                     | -                    | 37                 | 5                     | 35                   |
| <b>Shams et al. 2005<sup>†</sup></b> (83)     | 104                  | 50                    | 57                   | 206                 | 39                    | 52                   | 103                | 30                    | 41                   |
| <b>Hill et al. 2006<sup>*</sup></b> (105)     | 163                  | 46                    | 53                   | 372                 | 33                    | 32                   | 182                | 20                    | 15                   |

ELISPOT: Enzyme-linked immunospot assay, THT: Tuberkulin-Hauttest.

<sup>Δ</sup> Kontaktpersonen, die im selben Haushalt lebten oder im selben Büro arbeiteten, wurden zur Gruppe mit intensiver Exposition gerechnet. Als mittlere bzw. geringe Exposition wurden Kontaktdauern von kumulativ mindestens vier Stunden bzw. weniger als vier Stunden klassifiziert.

<sup>§</sup> Die Gruppe mit intensiver Exposition bestand aus Klassenkameraden des Indexpatienten. Schüler der Parallelklassen, die mehrmals bzw. einmal wöchentlich Schulveranstaltungen gemeinsam mit dem Indexpatienten besuchten, wurden in die Gruppe mit mittlerer bzw. geringer Exposition aufgenommen.

<sup>§</sup> Als intensiv exponiert galten 4 enge Familienmitglieder. Zur Gruppe mit mittlerer Exposition zählten Patientinnen, die mit der Indexpatientin ein Krankenzimmer geteilt hatten. Geringe Exposition bestand bei Mitpatientinnen, die mit der Indexpatientin gesprochen oder laut Krankenhausakten anderweitig geringen Kontakt gehabt hatten.

<sup>\*</sup> Kontaktpersonen mit intensiver bzw. mittlerer Exposition schliefen mit den Indexpatienten im selben Raum bzw. in einem Nebenraum, gering exponierte wohnten in einem anderen Haus.

<sup>#</sup> Zunächst erfolgte eine Einteilung in drei Gruppen anhand der Gesamtk Kontaktdauer (< 3 Std., 3-8 Std. und > 8 Std.), anschließend eine Gewichtung des Kontakts in eng (> 1 Std. im selben Raum mit < 2 m Abstand) oder nicht eng. Als intensiv exponiert galten Kontaktpersonen mit einer Gesamtk Kontaktdauer von über 8 Stunden und/oder engem Kontakt.

<sup>†</sup> Die Klassifizierung erfolgte anhand eines komplexen Kontakt-Scores, in dessen Berechnung folgende Variablen eingingen: Verhältnis der Kontaktpersonen zu den Indexpatienten, Infektiosität der Indexpatienten, Art und jeweilige Dauer des Kontakts.

Eine Ansteckung und damit ein positives Testergebnis sind umso wahrscheinlicher, je länger und enger der Kontakt zu einem Erkrankten bestand; die Infektiosität von *M. tuberculosis* korreliert mit der Dauer des Kontakts zum Index-Fall (68-70). Ein Test, der sensitiver und spezifischer als der THT ist, sollte also besser mit der Expositionsdauer korrelieren und außerdem nicht durch eine vorangegangene BCG-Impfung beeinflusst werden (50).

In dieser Studie war das Risiko für ein positives IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnis verglichen mit der Gruppe der Personen mit nur gelegentlicher Exposition 40,8mal höher (95%-Konfidenzintervall 6,9–240,3,  $p < 0,0001$ ) und das Risiko für ein positives THT-Ergebnis (Indurationsdurchmesser von  $\geq 5\text{mm}$ ) 19,3fach erhöht (95%-KI 2,7-137,5,  $p = 0,003$ ), wenn die Person engen Kontakt zum Indexfall gehabt hatte. Das Risiko für ein positives IL-2 ELISPOT-Ergebnis war bei Personen mit engem Kontakt zum Indexfall 2,5-fach höher (95%-Konfidenzintervall 0,3-23,0;  $p < 0,001$ ) als bei Personen mit nur gelegentlichem Kontakt.

Im Gegensatz zum IFN- $\gamma$ ELISPOT- und IL-2 ELISPOT-Ergebnis war das THT-Ergebnis stärker durch eine vorausgegangene BCG-Impfung beeinflusst, allerdings war dieses Ergebnis nicht signifikant.

In dieser Studie korrelierten die Ergebnisse des IFN- $\gamma$  ELISPOT besser mit dem Grad der Exposition als die des THT. Ähnliche Ergebnisse fanden Ewer et al. 2003 (79) in der bisher größten publizierten Umgebungsuntersuchung an einer Schule. Die untersuchten Schüler einer britischen Oberschule wurden aufgrund ihrer Expositionszeit in vier Gruppen eingeteilt. Über alle Gruppen hinweg korrelierte der IFN- $\gamma$  ELISPOT besser mit dem Grad der Exposition als der THT ( $p = 0,03$ ). Ein isoliert positives IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnis (also ein positives Ergebnis im ELISPOT bei einem gleichzeitig negativen im THT) war dabei deutlich stärker mit einer *M. tuberculosis*-Exposition assoziiert als ein isoliert positives THT-Ergebnis, was zu der Überlegung führt, dass isoliert positive IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnisse wahrscheinlicher ein richtig-positives Ergebnis anzeigen als isoliert positive THT-Ergebnisse (79).

In einer großen Umgebungsuntersuchung konnten Arend et al. 2007 (91) zeigen, dass selbst bei nicht geimpften Kontaktpersonen die Assoziation des IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnisses zur Expositionsdauer höher ist als die zwischen THT und Expositionsdauer.

Das IFN- $\gamma$  ELISPOT-Verfahren ist besonders in Ländern mit niedriger Inzidenz auch zum Ausschluss einer aktiven Tuberkulose geeignet, wie Meier et al. (94) in einer Untersuchung aus dem Jahr 2005 zeigen konnten. Unter 12 getesteten Patienten, bei denen eine Tuberkuloseerkrankung ausgeschlossen wurde, zeigten 11 ein negatives IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnis. Aktuelle Daten einer Meta-Analyse legen die Vermutung nahe, dass in Ländern mit niedriger Inzidenz der positive prädiktive Wert für die Entwicklung einer Tuberkulose von IGRAs dem des THT überlegen ist (54).

#### **4.5 Positiver prädiktiver Wert von THT und IFN- $\gamma$ ELISPOT**

Die Wahrscheinlichkeit einer tatsächlichen Infektion mit *M. tuberculosis* wird durch den positiven prädiktiven Wert (PPW) eines Testergebnisses beschrieben. Für den positiven prädiktiven Wert gilt:

$$\text{PPW} = \text{Sensitivität} \cdot \text{Prävalenz} / [\text{Sensitivität} \cdot \text{Prävalenz} + (1 - \text{Spezifität}) \cdot (1 - \text{Prävalenz})]$$

Der prädiktive Wert z.B. eines positiven Hauttest-Ergebnisses ist also stark abhängig von der Prävalenz der Tuberkuloseinfektion in der untersuchten Population (32). Bei einer angenommenen Sensitivität und Spezifität von jeweils 95% und einer Prävalenz der *M. tuberculosis*-Infektion von beispielsweise 30% ergäbe sich ein prädiktiver Wert für ein positives THT-Ergebnis von 89%. Dann läge also nur bei 11% der positiv Getesteten keine *M. tuberculosis*-Infektion vor (106). Bei einer Prävalenz von 1% und gleicher Sensitivität und Spezifität (je 95%) verschiebt sich der prädiktive Wert für ein positives Ergebnis im Hauttest dagegen auf 16%. In diesem Fall wären 84% der Personen mit positivem THT-Ergebnis nicht mit *M. tuberculosis* infiziert (106).

Der THT eignet sich also nicht als Screening-Methode in Populationen mit niedrigem Infektionsrisiko, z.B. bei Personen ohne Risikofaktoren in Ländern niedriger Tuberkulose-Inzidenz. Andererseits hat ein positiver Hauttest in Populationen mit



hoher Infektionswahrscheinlichkeit, z.B. bei Immigranten aus Ländern mit hoher Tuberkulose-Inzidenz oder auch im Rahmen von Umgebungsuntersuchungen, einen ausreichend hohen prädiktiven Wert. Allerdings ist bei der Anwendung des THT zu beachten, dass gerade in vielen Ländern mit höherer Tuberkulose-Inzidenz auch die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit nicht-tuberkulösen Mykobakterien höher ist und außerdem die BCG-Impfung häufiger verwendet wird, was beides wiederum zu falsch-positiven Testergebnissen führen kann.

Auch für die Überlegung, bei einer Kontaktperson nach Nachweis einer LTBI eine präventive Chemotherapie durchzuführen, ist der positive prädiktive Wert des Testergebnisses von Bedeutung: Wie bereits erwähnt, tragen erst kürzlich Infizierte das höchste Risiko, im Verlauf an einer aktiven Tuberkulose zu erkranken. Durch ein Testverfahren, das die erst kürzlich erfolgte Infektion mit *M. tuberculosis* detektieren kann, kann der positive prädiktive Wert eines Testergebnisses angehoben werden. Diese Personen würden von einer präventiven Chemotherapie in besonderem Maße profitieren. Durch eine Intervention wie beispielsweise der präventiven antituberkulösen Behandlung kann der positive prädiktive Wert eines Testergebnisses wiederum gesenkt werden.

Der positive prädiktive Wert für die Entwicklung einer aktiven Tuberkulose im Verlauf ist bei den IGRA-Verfahren vermutlich höher als beim THT. Diel et al. (107) fanden 2008 in einer großen Studie mit 601 Kontaktpersonen, dass 14,6% der initial IFN- $\gamma$ -ELISA-positiven Kontaktpersonen im Verlauf von zwei Jahren an Tuberkulose erkrankten, jedoch nur 2,3% der initial THT-positiven.

In einer Meta-Analyse von Diel et al. (54) aus dem Jahr 2010 zeigte sich ein ähnliches Ergebnis auch für den IFN- $\gamma$  ELISPOT: Nach 12 bis 24 Monaten entwickelten 3,3-10% der Personen, die initial positiv im IFN- $\gamma$  ELISPOT getestet worden waren, eine behandlungsbedürftige Tuberkulose. Unter den initial THT-positiven Personen war dieser Anteil mit 2,3-3,3% geringer. Allerdings bezogen sich einige der dabei ausgewerteten Studienergebnisse ausschließlich auf HIV-seropositive Personen.

In einer weiteren Untersuchung von Diel et al. (23) aus dem Jahr 2010 fand sich für Kontaktpersonen mit initial positivem IFN- $\gamma$  ELISA eine höhere Progressionsrate (12,9%) gegenüber initial THT-positiven (3,1%). Unter den IFN- $\gamma$  ELISA-positiven

Kindern entwickelten 28,6% eine behandlungsbedürftige Tuberkulose, verglichen mit 10,3% der initial IFN- $\gamma$  ELISA-positiven Erwachsenen.

Ein weiteres, bisher wenig untersuchtes Problem in der Diagnostik der LTBI stellen die Cut-off-Werte des THT sowie insbesondere des IFN- $\gamma$  ELISPOT dar; hierbei werden bisher die Grenzwerte für an Tuberkulose erkrankte auch auf gesunde Personen übertragen. Dies ist möglicherweise nicht ohne weiteres korrekt.

#### **4.6 Übereinstimmung von THT- und IFN- $\gamma$ ELISPOT-Ergebnissen**

Insgesamt wurden in dieser Studie 172 Kontaktpersonen mit dem THT untersucht, bei 167 Personen wurde eine Interferon- $\gamma$  ELISPOT-Testung durchgeführt. Sechs (3,4%) der 172 mit dem THT getesteten Personen wiesen ein positives Ergebnis auf, sieben (4,2%) zeigten ein positives IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnis.

Die Übereinstimmung von THT- und IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnissen war in dieser Studie relativ niedrig, verglichen mit anderen Untersuchungen (79, 84, 85, 97, 104, 105, 108). Vier (66%) von sechs Personen mit positivem THT zeigten ein negatives IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnis. Eine von drei Kontaktpersonen wurde im IFN- $\gamma$  ELISPOT positiv und dabei im THT negativ getestet, vier weitere Probanden mit positivem IFN- $\gamma$  ELISPOT-Testergebnis hatten leider keinen THT erhalten. Zumindest in zwei Fällen kann die fehlende Übereinstimmung durch eine vorausgegangene BCG-Impfung erklärt werden. Es ist bekannt, dass die Konstellation aus positivem THT bei gleichzeitig negativem IGRA-Ergebnis bei BCG-geimpften Personen häufiger auftritt als bei nicht geimpften (85, 86, 109). Menzies et al. berichten in ihrer Meta-Analyse von 2007 (110), dass ein positives IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnis bei 6-7% der Getesteten mit einem negativem THT einherging. Diese Gruppe machte 26% aller positiven IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnisse aus.

Eine große Gruppe von Kontaktpersonen (n=83) wurde im Rahmen dieser Umgebungsuntersuchung zunächst mit dem THT und anschließend mit dem IFN- $\gamma$  ELISPOT getestet. Eine Studie zeigte, dass eine vorherige Hauttestung die Immunreaktionen im IGRA beeinflussen kann: Im IFN- $\gamma$  ELISPOT fanden sich auch bei Personen mit negativem initialen Testergebnis nach vorheriger Anlage eines THT erhöhte Immunantworten (111).

Die Übereinstimmung von THT- und IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnissen ist abhängig von den gewählten Grenzwerten für ein positives Ergebnis. Bei der Testung von Kontaktpersonen im Rahmen der Umgebungsuntersuchung wird vom Deutschen Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose für den THT grundsätzlich weiterhin ein Grenzwert von  $\geq 5$  mm empfohlen (39). In einer Studie von Diel et al. von 2007 (87) zeigte sich, 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 reduzierte und die Korrelation der beiden Testverfahren deutlich verbesserte. Allerdings waren in unserer Studie, wie erwähnt, nur wenige Kontaktpersonen BCG-geimpft.

#### **4.7 Unklare ELISPOT-Ergebnisse**

In dieser Umgebungsuntersuchung fanden sich in 4 Fällen (2,4%) unklare IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnisse, d.h., hier war die Positiv-Kontrolle nicht positiv oder die Negativ-Kontrolle nicht negativ. In einer Untersuchung von Beffa et al. aus dem Jahr 2007 (112) waren 2% der ELISPOT-Testungen ohne klares Ergebnis. Höhere prozentuale Anteile fanden sich bei Immunsupprimierten und bei älteren Personen, außerdem bei Untersuchungen in den Wintermonaten. Unklare Ergebnisse sind dabei in der Regel durch einen der drei folgenden Effekte zu erklären: Immunsupprimierende Medikamente oder Erkrankungen führen zu einer schwachen zellulären Immunantwort und damit zu einer zu geringen Anzahl von Interferon-produzierenden Zellen in der Positiv-Kontrolle (113). Zweitens kann die Aktivität der Zellen durch den Transport beeinträchtigt werden (114), z.B. durch Kälte, was den höheren Anteil nicht auswertbarer Ergebnisse in den Wintermonaten erklärt. Auch Fehler in der technisch aufwändigen Probenverarbeitung können das Testergebnis beeinflussen. Beffa et al. (112) fanden außerdem, dass mehr als 75% der zunächst nicht auswertbaren Proben bei wiederholtem Testen klar positive oder negative Ergebnisse zeigten.

Unklare Testergebnisse treten beim ELISA-Verfahren (*QuantiFERON-TB Gold In-Tube*) signifikant häufiger auf als bei Verwendung des IFN- $\gamma$  ELISPOT (*T-SPOT.TB*), wie eine italienische Studie zeigt (97). Ferrara et al. fanden höhere prozentuale Anteile an unklaren Ergebnissen außerdem bei Kindern unter 5 Jahren und bei Immunsupprimierten (97).

#### **4.8 Testkonversion und -reversion**

Ein weiteres Problem ist das der Testkonversion und -reversion. Hill et al. fanden in ihrer Studie (104), dass es nach *M. tuberculosis*-Exposition sowohl zu IFN- $\gamma$  ELISPOT-Konversionen als auch zu ELISPOT-Reversionen kommt. Eine IFN- $\gamma$  ELISPOT-Reversion wurde viel häufiger beobachtet als eine Reversion des THT und auch häufiger als eine ELISPOT-Konversion (innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von drei Monaten). Diese Tatsache wird besonders wichtig in Fällen, in denen der Zeitpunkt der Exposition mit *M. tuberculosis* nicht bekannt ist. Allerdings ist zumindest der Effekt der Reversion in dieser Umgebungsuntersuchung – mit einer Testung der Kontaktpersonen innerhalb von einigen Wochen nach Exposition – möglicherweise weniger wichtig.

Eine zuvor erfolgte Hauttestung hat bei initial positivem IFN- $\gamma$  ELISPOT offenbar keine Auswirkung auf das ELISPOT-Ergebnis. Bei initial negativem IFN- $\gamma$  ELISPOT könnte es jedoch durch Anlage eines THT möglicherweise zu einer Konversion des IFN- $\gamma$  ELISPOT kommen, die Studienlage ist hier allerdings nicht eindeutig (115). Im Rahmen der Umgebungsuntersuchung erfolgten die Blutentnahmen und die Tuberkulin-Hauttestungen zum selben Zeitpunkt. Dieses Vorgehen wird in den aktuellen kanadischen Richtlinien zur ELISPOT-Testung bereits empfohlen (116).

#### **4.9 Interleukin-2 ELISPOT**

Die Einführung der IGRA stellte einen wichtigen Fortschritt in der Diagnostik der LTBI dar (107). Allerdings kann der aus Zellen aus dem peripheren Blut allein durchgeführte IGRA nicht zwischen aktiver Tuberkulose und LTBI unterscheiden (92). Darüber hinaus ist das Verfahren bei Personen mit LTBI nicht zuverlässig in der Lage, diejenigen mit einer erst kürzlich erworbenen Infektionen zu identifizieren, die bekanntermaßen das höchste Risiko haben, eine aktive Tuberkulose zu entwickeln (117, 118).

Pathan et al. (78) konnten zeigen, dass die Anzahl von ESAT-6 spezifischen IFN- $\gamma$  sezernierenden CD4-T-Zellen während einer antituberkulösen Therapie fällt. In anderen Studien wurde dagegen unter antituberkulöser Therapie eine Zunahme der IFN- $\gamma$ -Immunreaktion gegen ESAT-6 beobachtet (76, 119, 120). Ravn et al. (74)

konnten über einen Beobachtungszeitraum von 6 Monaten keinen Unterschied in der Reaktion auf einen ESAT-6-basierenden ELISA unter Chemotherapie nachweisen.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass neben IFN- $\gamma$  auch andere Biomarker verwendet werden können, die – allein oder in Kombination – die diagnostische Aussagekraft des IFN- $\gamma$  ELISPOT erhöhen (55, 121, 122). Eine dieser Substanzen ist das IL-2, das die T-Zell-Replikation triggert und die Granulombildung fördert. Die immunologische Rolle von IL-2 im Verlauf einer Infektion mit *M. tuberculosis* ist komplex.

In einer türkischen Studie wurden 2004 die Serumkonzentrationen von IFN- $\gamma$  und IL-2 im Krankheitsverlauf der behandlungsbedürftigen Tuberkulose untersucht. Bei 18 Patienten wurden die Konzentration von IFN- $\gamma$  und IL-2 im Serum zunächst vor Behandlungsbeginn und dann zwei Monate nach Therapieende gemessen. Sowohl die Serumkonzentration von IFN- $\gamma$  als auch die von IL-2 sank unter Behandlung ab (122).

Eine britische Studie von 2007 untersuchte die Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2 durch *M. tuberculosis*-Antigen-spezifische T-Zellen im Krankheitsverlauf der aktiven Tuberkulose (55). Im ELISPOT-Verfahren wurde die Sekretion der beiden Mediatoren zunächst vor Behandlungsbeginn – also bei hoher MTB-Antigenlast – und anschließend nach Therapieabschluss und damit bei niedrigerer Antigenlast bestimmt. Es zeigte sich eine Verschiebung im IFN- $\gamma$ - und IL-2-Zytokin-Profil: Während bei den 23 untersuchten Patienten die IFN- $\gamma$ -Sekretion im Verlauf sank, stieg die Sekretion von IL-2 unter Behandlung an. Die gleichzeitige Messung der IFN- und IL-2-Sekretion auf Einzelzell-Ebene ergab, dass zunächst Zellen vorherrschten, die ausschließlich IFN- $\gamma$  oder beide Mediatoren sezernierten, während unter und nach Abschluss der antituberkulösen Therapie eher Zellen nachgewiesen wurden, die entweder beide Mediatoren oder ausschließlich IL-2 sezernierten (55).

Biselli et al. (123) konnten 2010 zeigen, dass mit einem ELISA-Verfahren durch die Verwendung von IL-2 als zweitem Marker zusätzlich zu IFN- $\gamma$  nicht nur eine Unterscheidung zwischen *M. tuberculosis*-Infizierten und gesunden Personen einer

Kontrollgruppe möglich war, sondern auch zwischen Personen mit LTBI und Patienten mit aktiver Tuberkulose.

Von 274 Kontaktpersonen wurden in dieser Studie 196 (71,5%) mit dem IL-2 ELISPOT getestet. Sechs (3,1%) von ihnen zeigten dabei ein positives Ergebnis, unter ihnen waren drei mit positiven sowie drei mit negativem IFN- $\gamma$  ELISPOT-Ergebnis. Die mittlere Expositionsdauer zum Indexpatienten war unter den IL-2 ELISPOT-positiven (32 h, IQR 24\_48 h) niedriger als unter den IFN- $\gamma$  ELISPOT-positiven Kontaktpersonen (130 h, IQR 24\_1000 h), allerdings war das Ergebnis statistisch nicht signifikant ( $p=0,15$ ).

Unter den sechs Personen mit positivem IL-2 ELISPOT-Ergebnis gab eine Lehrerin einen lange zurückliegenden Kontakt zu Tuberkulose an. Eine antituberkulöse Therapie war nicht erfolgt. Ihr IL-2 ELISPOT zeigte den höchsten Wert unter allen getesteten Kontaktpersonen, ihr IFN- $\gamma$  ELISPOT war ebenfalls positiv.

Dieser Befund ist vergleichbar mit dem von Patienten mit aktiver Tuberkulose nach erfolgter Therapie (55). Millington et al. konnten in ihrer Untersuchung von 23 Patienten mit aktiver Tuberkulose zeigen, dass sich unter Behandlung eine Verschiebung im IFN- $\gamma$ - und IL-2-Zytokin-Profil ergab (55); die zusätzliche Verwendung eines IL-2 ELISPOT kann zusätzliche Informationen zum Infektionsverlauf liefern. Möglicherweise ist in der Diagnostik der LTBI durch einen zusätzlichen IL-2 ELISPOT eine Unterscheidung möglich zwischen akuter Immunantwort nach kürzlich erfolgtem Kontakt und chronischer Immunantwort nach weiter zurückliegendem Kontakt.

#### **4.10 *M. tuberculosis*-Übertragung und Fälle von LTBI**

In dieser Umgebungsuntersuchung fanden sich überraschend wenige Fälle einer möglichen Übertragung von *M. tuberculosis*. Nur 7 (4,2%) von 167 IFN- $\gamma$  ELISPOT-getesteten zeigten ein positives Testergebnis. Keine der 274 Kontaktpersonen entwickelte bisher eine aktive Tuberkulose. Dies ist eine niedrigere Übertragungsrate verglichen mit anderen Umgebungsuntersuchungen, wie z.B. in der Untersuchung von Ewer et al. 2003 an einer britischen Schule (79). Dort fand man unter 535 Kontaktpersonen 97 Fälle von LTBI und neun Fälle von aktiver Tuberkulose.

Gut dokumentierte Fälle von Infektionen mit *M. tuberculosis* auch nach sehr kurzer Exposition sind mehrfach beschrieben (68, 69, 82). In dieser Studie war der Indexpatient wahrscheinlich über einen Zeitraum von ungefähr sieben Monaten infektiös gewesen. Ewer et al. (79) fanden 2003 in ihrer Studie, dass ein Kontakt von 130 Stunden, die mit einem Patienten mit Sputum-positiver kaverner Lungen Tuberkulose im selben Klassenraum verbracht wurden, sicher zur Infektion führte. In dieser Arbeit fanden sich dagegen auch bei Kontaktpersonen mit Expositionszeiten von bis zu 240 Stunden noch negative Ergebnisse in allen Testverfahren. Der Grad der aerogenen Übertragung von *M. tuberculosis* und/oder die Infektiosität von Patienten mit kaverner Tuberkulose, bei denen säurefeste Stäbchen im Sputum nachgewiesen werden können, sind offenbar sehr variabel.

#### **4.11 Analyse der durch den *M. tuberculosis*-Stamm des Indexpatienten induzierten TNF- $\alpha$ -Bildung ex vivo**

Lange wurde angenommen, dass das *M. tuberculosis* eine sehr hohe Sequenzhomologie und damit nur eine geringe Antigendiversität aufweist. Durch die Fortschritte in der Genotypisierung von *M. tuberculosis* wurde dann jedoch deutlich, dass die genetische Diversität von Isolaten des *M. tuberculosis*-Komplexes tatsächlich sehr groß ist (64). Diese genetische Diversität von *M. tuberculosis*-Isolaten hat auch Auswirkungen auf den Verlauf der Erkrankung. In einem Mausmodell mit experimenteller Tuberkulose-Infektion wurde gezeigt, dass genetisch unterschiedliche *M. tuberculosis*-Stämme deutlich unterschiedliche immunpathologische Reaktionen hervorriefen (124). *M. tuberculosis*-Isolate vom *Beijing*-Genotyp, der in Asien und im südlichen Afrika weit verbreitet ist, zeigten dabei die höchste Virulenz.

Unter den proinflammatorischen Zytokinen ist der Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) wesentlich an der Ausbildung einer schützenden Immunität gegen *M. tuberculosis* beteiligt (125). So ist z.B. die Bildung und die Erhaltung von Granulomen abhängig vom Vorhandensein dieses Zytokins in ausreichender Konzentration (126, 127). Dies wurde in verschiedenen Situationen nachgewiesen, u.a. bei der Therapie mit TNF- $\alpha$ -Antagonisten, beim TNFR/p55-Mangel und beim TNF- $\alpha$ -Mangel (128). Bei Personen mit LTBI und systemisch reduzierten TNF- $\alpha$ -Spiegel, z.B. unter Therapie mit TNF- $\alpha$ -

Antagonisten, findet sich ein signifikant erhöhtes Risiko der Reaktivierung einer Tuberkulose (129-131).

Jedoch scheint die Rolle von TNF- $\alpha$  auch unter *in-vitro*-Bedingungen komplex: In dieser Studie induzierte der beim Indexpatienten isolierte MTB-Stamm 9729/07 im Vergleich zum virulenten Laborstamm H37Rv in menschlichen THP-1-Zellen sowie in MDM-Zellen eine signifikant verminderte TNF- $\alpha$ -Bildung (nach *ex vivo* Infektion). Eine ähnlichen Studie zeigte, dass nach Infektion von menschlichen Alveolarmakrophagen mit virulenten MTB-Stämmen *in vitro* die Sekretion von TNF- $\alpha$  signifikant höher war als nach Infektion mit attenuierten Stämmen, die TNF- $\alpha$ -Konzentration korrelierte mit der Fähigkeit der Stämme zur intrazellulären Vermehrung (132). Außerdem zeigte sich, dass die Behandlung von infizierten Makrophagen mit neutralisierenden Anti-TNF- $\alpha$ -Antikörpern die intrazelluläre Wachstumsrate von *M. tuberculosis* reduzierte, während die bakterielle Replikation durch die Zugabe von exogenem TNF- $\alpha$  wieder erhöht wurde (132).

Die reduzierte TNF- $\alpha$ -Freisetzung durch den beim Indexpatienten isolierten *M. tuberculosis*-Stamm 9729/07 könnte also mit einer im Vergleich zum Laborstamm geringeren Virulenz dieses Stamms und damit einer relativ niedrigen Übertragungsrate unter den untersuchten Kontaktpersonen zusammenhängen. Die Übertragung dieses Befundes einer reduzierten TNF- $\alpha$ -Induktion *in vitro* auf eine geringe Infektionsrate *in vivo* ist jedoch nicht ohne weiteres möglich. Die Tatsache, dass ein Isolat die TNF- $\alpha$ -Bildung in THP-1-Zellen sowie in MDM-Zellen in einem geringeren Maße induziert als ein anderer Stamm, ist dabei wohl nur von geringer Relevanz, besonders weil die beiden untersuchten Stämme zu unterschiedlichen Genotypen gehören: Der Stamm des Indexpatienten wurde als ostafrikanisch-indischer Stamm identifiziert, der Labor-Stamm als ein Haarlem-Subtyp. Eine ausführlichere und systematische Beurteilung dieses Zusammenhangs muss unter Einbeziehung einer größeren Anzahl klinischer Isolate in weiteren Studien erfolgen.

#### **4.12 Einschränkungen**

Mehrere Einschränkungen zur allgemeinen Aussagefähigkeit der Untersuchungsergebnisse müssen angesprochen werden. Dieser Studie lag eine Umgebungsuntersuchung zugrunde, die in Zusammenarbeit mit dem



Gesundheitsamt schnellstmöglich durchgeführt werden musste. Die untersuchte Population war dabei sehr heterogen z.B. in ihrer Altersstruktur mit einem hohen Anteil an Kindern. Nicht alle Kontaktpersonen nahmen an der Studie teil und nicht bei allen teilnehmenden Kontaktpersonen konnten alle drei Testverfahren durchgeführt werden.

Wegen der relativ geringen Anzahl von positiven Testergebnissen im IFN- $\gamma$  ELISPOT können die genannten Schlussfolgerungen über den zusätzlichen diagnostischen Wert des IL-2 ELISPOT nicht endgültig sein und müssen in ähnlichen Umgebungsuntersuchungen mit einer höheren Zahl von positiven IGRA-Ergebnissen bestätigt werden. In größeren Längsschnittstudien sollte untersucht werden, ob das Risiko einer aktiven Tuberkulose bei Kontaktpersonen mit positivem IFN- $\gamma$  ELISPOT- und negativem IL-2 ELISPOT-Ergebnis höher ist als bei Kontaktpersonen mit jeweils positivem IFN- $\gamma$  und IL-2 ELISPOT-Testergebnis.

Außerdem ist anzumerken, dass eine ursächliche Beziehung zwischen der *ex vivo* beobachteten verminderten Fähigkeit zur TNF- $\alpha$ -Induktion durch den beim Indexpatienten isolierten *M. tuberculosis*-Stamm und seiner *in vivo* beobachteten reduzierten Virulenz bzw. seiner relativ geringen Übertragungsrate nicht nachzuweisen ist.

#### **4.13 Offene Fragen**

Zur weiteren Evaluation der Einsatzfähigkeit des IL-2 ELISPOTs in Kombination mit dem IFN- $\gamma$  ELISPOT sind zusätzliche Untersuchungen notwendig. Hierzu gehören:

1. Längsschnittstudien mit einer größeren Anzahl von Kontaktpersonen mit positiven *M. tuberculosis*-spezifischen Immunreaktionen.
2. Studien zur Überprüfung der Cut-off-Werte der verschiedenen Testverfahren bei gesunden Kontaktpersonen.
3. Studien zur Untersuchung des positiven prädiktiven Wertes eines Testergebnisses.
4. Studien zur Beurteilung der o.g. Testkombination im Monitoring von Chemotherapien, bzw. als Verlaufsparemeter nach einer Therapie.

#### 4.14 Fazit

Im Rahmen einer großen Tuberkulose-Umgebungsuntersuchung wurde in dieser Studie der IL-2 ELISPOT als ein mögliches neues Testverfahren zur Identifizierung von kürzlich erfolgten Infektionen mit *M. tuberculosis* mit den beiden etablierten Verfahren, dem THT und dem IFN- $\gamma$  ELISPOT, verglichen. Durch ein Testverfahren, das die erst kürzlich erfolgte Infektion mit *M. tuberculosis* detektieren kann, kann der positive prädiktive Wert eines Testergebnisses angehoben werden. Erst kürzlich infizierte Kontaktpersonen tragen das höchste Risiko, im Verlauf an einer aktiven Tuberkulose zu erkranken und würden von einer präventiven Chemotherapie in besonderem Maße profitieren.

Hintergrund der Überlegung, zwei ELISPOT-Verfahren zu kombinieren, waren u.a. die Studienergebnisse von Millington et al. (55), die im Krankheitsverlauf der behandlungsbedürftigen Tuberkulose (also unter sinkender *M. tuberculosis*-Antigenlast) sinkende IFN- $\gamma$ - und ansteigende IL-2-Sekretionen nachweisen konnten. Nun galt es, den IL-2 ELISPOT auch auf seine Eigenschaften als potenziellen Verlaufssparameter im Verlauf einer LTBI hin zu untersuchen.

In dieser Studie erlaubte die Kombination aus IFN- $\gamma$  ELISPOT und IL-2 ELISPOT eine bessere Unterscheidung zwischen kürzlich erfolgten und länger zurückliegenden Infektionen mit *M. tuberculosis* als der IFN- $\gamma$  ELISPOT oder der THT allein. Personen mit positivem Ergebnis im IFN- $\gamma$  ELISPOT und gleichzeitig negativem im IL-2 ELISPOT wiesen die höchsten Kontaktdauern zum Indexpatienten auf und hatten damit die höchste Wahrscheinlichkeit für eine kürzlich zurückliegende Infektion mit *M. tuberculosis*.

Sollten sich die o.g. Ergebnisse in weiteren Studien bestätigen, würde dieses Kombinationsverfahren eine bedeutende Weiterentwicklung in der Diagnostik der LTBI darstellen. Ob durch die Kombination von IFN- $\gamma$  ELISPOT und IL-2 ELISPOT der positive prädiktive Wert für die Entwicklung einer behandlungsbedürftigen Tuberkulose bei Kontaktpersonen angehoben werden kann und damit ein deutlich effektiverer Einsatz der präventiven Chemotherapie möglich wird, muss in großen Längsschnittstudien ermittelt werden.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde im Rahmen einer großen Umgebungsuntersuchung erstmalig bei gesunden Kontaktpersonen eines Patienten mit ansteckungsfähiger Lungentuberkulose ein neues Testverfahren zur Unterscheidung von kürzlich erfolgten gegenüber länger zurückliegenden Infektionen mit *M. tuberculosis* evaluiert. Dabei wurde der IL-2 ELISPOT mit den beiden etablierten Verfahren Tuberkulin-Hauttest und Interferon- $\gamma$  ELISPOT verglichen.

Ziel von Umgebungsuntersuchungen ist zum einen die aktive Fallsuche nach Tuberkulose-Kranken sowie zum anderen die Identifikation von nicht Tuberkulose-Kranken mit latenter Infektion mit *M. tuberculosis* (LTBI), deren Risiko an einer Tuberkulose zu erkranken durch eine präventive Chemotherapie gesenkt werden kann.

Weder der Tuberkulin-Hauttest noch der Interferon- $\gamma$  ELISPOT können zuverlässig diejenigen Personen identifizieren, die erst kürzlich mit *M. tuberculosis* infiziert wurden. Diese tragen das höchste Risiko, im Verlauf an einer aktiven Tuberkulose zu erkranken und würden daher von einer präventiven Chemotherapie in besonderem Maße profitieren. Eine potentielle Ergänzung in der Diagnostik der LTBI, der IL-2 ELISPOT, wurde in dieser Studie untersucht.

Die in dieser Arbeit beschriebene Umgebungsuntersuchung umfasste 274 Kontaktpersonen eines Lehrers mit Sputum- und Kultur-positiver, Isoniazid- und Streptomycin-resistenter Lungentuberkulose. Neben Schülern und Kollegen des Lehrers, der an einer Grund- und an einer Gesamtschule in Lübeck-Schlutup unterrichtet hatte, wurden auch Mitglieder seiner Kirchengemeinde, Musiker seiner Kirchenband, sein Gitarrenschüler sowie Freunde und Familienmitglieder untersucht.

Die Umgebungsuntersuchung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Gesundheitsamt der Stadt Lübeck. Bei den Kontaktpersonen wurde ein Hauttest angelegt und/oder eine Blutentnahme zur ELISPOT-Testung vorgenommen. Außerdem wurden mittels eines Fragebogens epidemiologische Daten wie Expositionsdauer und Impfstatus erhoben.

Um mögliche Hinweise auf die Virulenz des beim Indexpatienten isolierten *M. tuberculosis*-Stammes zu erhalten, erfolgte schließlich neben der Genotypisierung eine Analyse der TNF- $\alpha$ -Induktion dieses Stammes *in vitro*.

Die Arbeit erbrachte drei wichtige Ergebnisse:

1. Trotz einer im Vergleich zu anderen Umgebungsuntersuchungen starken und lang andauernden Exposition zum Indexfall fand sich in einer großen Gruppe von Kontaktpersonen nur bei jeweils weniger als fünf Prozent der Untersuchten ein positives Testergebnis. Die *M. tuberculosis*-Übertragungsrate vom Indexpatienten auf die Kontaktpersonen war damit relativ gering. Keine der Kontaktpersonen entwickelte eine aktive Tuberkulose.
2. *In vitro* zeigte der beim Indexpatienten isolierte *M. tuberculosis*-Stamm eine schwächere Zellaktivierung: Im Vergleich zum Laborstamm H37Rv induzierte der Stamm 9729/07 in menschlichen THP-1-Zellen sowie in MDM-Zellen eine um 30-50% geringere TNF- $\alpha$ -Bildung. Die geringere Induktion von TNF- $\alpha$  deutet auf eine attenuierte Virulenz dieses Stammes hin. Dieser Umstand könnte die geringe Übertragungsrate erklären.
3. Die Kombination aus IFN- $\gamma$  ELISPOT und IL-2 ELISPOT erlaubte eine bessere Unterscheidung zwischen kürzlich erfolgten und länger zurückliegenden Infektionen mit *M. tuberculosis* als der IFN- $\gamma$  ELISPOT oder der THT allein. Personen mit positivem Ergebnis im IFN- $\gamma$  ELISPOT und gleichzeitig negativem im IL-2 ELISPOT wiesen die höchsten Kontaktdauern zum Indexpatienten auf und hatten damit die höchste Wahrscheinlichkeit für eine kürzlich zurückliegende Infektion mit *M. tuberculosis*. Wenn sich in Längsschnittstudien bestätigt, dass Kontaktpersonen mit positivem Testergebnis im IFN- $\gamma$  ELISPOT und negativem im IL-2 ELISPOT ein höheres Risiko haben, an einer Tuberkulose zu erkranken, ist mit den Ergebnissen dieser Arbeit der Grundstein für eine Optimierung der zielgerichteten präventiven Chemotherapie gelegt.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Fitzgerald DH. Mycobacterium tuberculosis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6 ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.
2. Oh P, Granich R, Scott J. Human exposure following Mycobacterium tuberculosis infection of multiple animal species in a Metropolitan Zoo. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(11):1290-93.
3. Zink AR, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H et al. Characterization of Mycobacterium tuberculosis complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J Clin Microbiol.* 2003;41(1):359-67.
4. Zink AR, Grabner W, Reischl U, Wolf H, Nerlich AG. Molecular study on human tuberculosis in three geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt. *Epidemiol Infect.* 2003;130(2):239-49.
5. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med.* 2006;100(11):1862-70.
6. Konomi N, Lebwohl E, Mowbray K, Tattersall I, Zhang D. Detection of mycobacterial DNA in Andean mummies. *J Clin Microbiol.* 2002;40(12):4738-40.
7. Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA. Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91:2091-4.
8. Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt CL, Lev-Maor G, Bar-Gal GK, Matheson C et al. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(9):584-92.
9. Deichgräber K. Die Patienten des Hippokrates. Historisch-prosopographische Beiträge zu den Epidemien des Corpus Hippocraticum. 1. Aufl. Mainz: Franz Steiner, 1982.
10. Marten, B. A new theory of consumptions: more especially of a phthisis, or consumption of the lungs. London: T. Knaplock, 1720.
11. Koch, R. Die Aetiologie der Tuberculose. *Berl Klin Wochenschr.* 1882;19(15):221-30.
12. Manchester K. Tuberculosis and leprosy in antiquity: an interpretation. *Med Hist.* 1984;28(2):162-73.
13. Krause AK. Tuberculosis and public health. *Am Rev Tuberc.* 1982;18:271-322.
14. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO Report 2010. Geneva 2010.
15. Corbett EL, Marston B, Churchyard GJ, De Cock KM. Tuberculosis in sub-Saharan Africa: opportunities, challenges, and change in the era of antiretroviral treatment. *Lancet.* 2006;367(9514):926-37.
16. Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pawinski R, Govender T, Lalloo U et al. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet.* 2006;368(9547):1575-80.
17. Raviglione MC, Smith, IM. XDR tuberculosis – implications for global public health. *N Engl J Med.* 2007;356:656–9.
18. Robert Koch-Institut. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2008. Berlin 2010.
19. Kaufmann SHE, Hahn H. Mycobacteria and TB. 1. Aufl. Basel: Karger, 2003.
20. Geng E, Kreiswirth B, Burzynski J, Schluger NW. Clinical and radiographic correlates of primary and reactivation tuberculosis: a molecular epidemiology study. *JAMA.* 2005;293(22):2740-5.

21. Mack U, Migliori GB, Sester M, Rieder HL, Ehlers S, Goletti D et al. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *M. tuberculosis*? A TBNET consensus statement. *Eur Respir J*. 2009;33(5):956-73.
22. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(9):578-90.
23. Diel R, Loddenkemper R, Niemann S, Meywald-Walter K, Nienhaus A. Negative and Positive Predictive Value of a Whole-Blood IGRA for Developing Active TB - An Update. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010. [Epub ahead of print].
24. Raviglione MC, Snider DE Jr., Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA*. 1995;273(3):220-6.
25. Small PM, Fujiwara PI. Management of tuberculosis in the United States. *N Engl J Med*. 2001;345(3):189-200.
26. Luelmo F. BCG vaccination. *Am Rev Resp Dis*. 1982;125(3):70-2.
27. Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis*. 1993;17(6):968-75.
28. Menzies R, Vissandjee B. Effect of bacille Calmette-Guerin vaccination on tuberculin reactivity. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145(3):621-25.
29. Pirquet C. Tuberkulin-Diagnose durch cutane Impfung. *Berl Klin Wochenschr*. 1907;44:644-5.
30. Mendel F. Die von Pirquetsche Hautreaktion und die intravenöse Tuberkulinbehandlung. *Med. Klin*. 1908;12:402-4.
31. Mantoux C. L'intradermo-réaction à la tuberculine et son interprétation clinique. *Presse Méd*. 1910;18:10-13.
32. Rieder HL. Epidemiologic basis of tuberculosis control. 1 ed. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 1999.
33. Menzies RI. Tuberculin skin testing. In: Reichman LB, Hershfield ES. *Tuberculosis: a comprehensive international approach*. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 2000.
34. Wang L, Turner MO, Elwood RK, Schulzer M, Fitzgerald JM. A metaanalysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax*. 2002;57:804-9.
35. Sokal JE. Editorial: Measurement of delayed skin-test responses. *N Engl J Med*. 1975;293(10):501-2.
36. American Thoracic Society. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:221-47.
37. Schaberg T, Hauer B, Haas WH, Hohlfeld J, Kropp R, Loddenkemper R et al. Latente tuberkulöse Infektion: Empfehlungen zur präventiven Therapie bei Erwachsenen in Deutschland; Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose. *Pneumologie*. 2004;58(4):255-70.
38. Markowitz N, Hansen NI, Wilcosky TC, Hopewell PC, Glassroth J, Kvale PA 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(3):185-93.
39. Diel R, Forssbohm M, Loytved G, Haas W, Hauer B, Maffei D et al. Empfehlungen für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose. Deutsches Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose. *Pneumologie*. 2007;61:440-55.
40. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol*. 1996;178(5):1274-82.
41. Harboe M, Oettinger T, Wilker HG, Rosenkrands I, Andersen P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent

- Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 1996;64:16-22.
42. 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(4):606-9.
  43. Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P, Cole ST, Brosch R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol.* 2004;12(11):500-8.
  44. Gey van Pittius NC, Sampson SL, Lee H, Kim Y, van Helden PD, Warren RM. Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (*esx*) gene cluster regions. *BMC Evol Biol.* 2006;6:95.
  45. 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(5):1710-7.
  46. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(4):824-8.
  47. Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA, Pathan AA, Ewer K, Ayles H 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(17):2285-93.
  48. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet.* 2000;356(9235):1099-104.
  49. Lalvani A, Brookes R, Hambleton S, Britton WJ, Hill AV, McMichael AJ. Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *J Exp Med.* 1997;186(6):859-65.
  50. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, Deeks JJ et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet.* 2001;357(9273):2017-21.
  51. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170(1):59-64.
  52. Richeldi L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(7):736-42.
  53. Leidl L, Mayanja-Kizza H, Sotgiu G, Baseke J, Ernst M, Hirsch C et al. Relationship of immunodiagnostic assays for tuberculosis and numbers of circulating CD4+ T-cells in HIV infection. *Eur Respir J.* 2010;35(3):619-26.
  54. Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B et al. Interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of latent *M. tuberculosis* infection: A systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J.* 2010. [Epub ahead of print].
  55. Millington KA, Innes JA, Hackforth S, Hinks TSC, Deeks JJ, Dosanjh DP et al. Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells and antigen load. *J Immunol.* 2007;178(8):5217-26.
  56. Vincenti D, Carrara S, De Mori P, Pucillo LP, Petrosillo N, Palmieri F et al. Identification of early secretory antigen target-6 epitopes for the immunodiagnosis of active tuberculosis. *Mol Med.* 2003;9(3-4):105-11.
  57. Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinge WM, Gori A, Al-Hajjaj SA et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international

- spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* 2006;6:23.
58. Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:2869-73.
  59. Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:328-37.
  60. Niemann S, Harmsen D, Ruesch-Gerdes S, Richter E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3231-34.
  61. Reiling N, Blumenthal A, Flad HD, Ernst M, Ehlers S. Mycobacteria-induced TNF-alpha and IL-10 formation by human macrophages is differentially regulated at the level of mitogen-activated protein kinase activity. *J Immunol.* 2001;167(6):3339-45.
  62. Bortz J. Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler. 6. Aufl. Berlin/Heidelberg/New York: Springer, 2005.
  63. Bortz J, Döring N. Forschungsmethoden und Evaluation für Human- und Sozialwissenschaftler. 4. Aufl. Berlin/Heidelberg/New York: Springer, 2005.
  64. Wirth T, Hildebrand F, Allix-Beguec C, Wolbeling F, Kubica T, Kremer K et al. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathog.* 2008;4(9):e1000160.
  65. Krummel B, Strassburg A, Ernst M, Reiling N, Eker B, Rath H et al. Potential Role for IL-2 ELISpot in Differentiating Recent and Remote Infection in Tuberculosis Contact Tracing. *PLoS One.* 2010;5(7):e11670.
  66. Erkens CG, Kamphorst M, Abubakar I, Bothamley GH, Chemtob D, Haas W et al. Tuberculosis contact investigation in low prevalence countries: a European consensus. *Eur Respir J.* 2010;36(4):925-49.
  67. Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Clinical practice. Latent tuberculosis infection. *N Engl J Med.* 2002;347(23):1860-6.
  68. Grzybowski S, Barnett GD, Styblo K. Contacts of cases of active pulmonary tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc.* 1975;50(1):90-106.
  69. Kenyon TA, Valway SE, Ihle WW, Onorato IM, Castro KG. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* during a long airplane flight. *N Engl J Med.* 1996;334(15):933-8.
  70. Small PM, Hopewell PC, Singh SP. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med.* 1994;330(24):1703-9.
  71. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: An update. *Ann Intern Med.* 2008;149:177-84.
  72. Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KL, Subronto YW, Wieles B, Arend SM et al. Identification and characterization of the ESAT-6 homologue of *Mycobacterium leprae* and T-cell cross-reactivity with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2002;70:2544-48.
  73. Mazurek GH, LoBue PA, Daley CL, Bernardo J, Lardizabal AA, Bishai WR et al. Comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing for detecting latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *JAMA.* 2001;286:1740-47.
  74. Ravn P, Demissie A, Eguale T, Wondwosson H, Lein D, Amoudy HA et al. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 1999;179(3):637-45.



75. 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(10):6073-6.
76. Vekemans J, Lienhardt C, Sillah JS, Wheeler JG, Lahai GP, Doherty MT 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(10):6554-7.
77. Arend SM, Engelhard AC, Groot G, de Boer K, Andersen P, Ottenhoff TH 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(6):1089-96.
78. Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, McShane H, Davidson RN, Pasvol G 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(9):5217-25.
79. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, Bryant G, Waller S, Andersen P 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(9364):1168-73.
80. 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(1):65-9.
81. Vekemans J, Ota MO, Sillah J, Fielding K, Alderson MR, Skeiky YA et al. Immune responses to mycobacterial antigens in the Gambian population: implications for vaccines and immunodiagnostic test design. *Infect Immun*. 2004;72(1):381-8.
82. Richeldi L, Ewer K, Losi M, Bergamini BM, Roversi P, Deeks J et al. T cell-based tracking of multidrug resistant tuberculosis infection after brief exposure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(3):288-95.
83. Shams H, Weis SE, Klucar P, Lalvani A, Moonan PK, Pogoda JM et al. Enzyme-linked immunospot and tuberculin skin testing to detect latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(9):1161-8.
84. 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(11):1242-7.
85. Kang YA, Lee HW, Yoon HI, Cho B, Han SK, Shim YS 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(22):2756-61.
86. Diel R, Nienhaus A, Lange C, Meywald-Walter K, Forssbohm M, Schaberg T. Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res*. 2006;7(1):77.
87. Diel R, Ernst M, Döscher G, Visuri-Karbe L, Greinert U, Niemann S et al. Avoiding the effect of BCG-vaccination in detecting MTB infection with a blood test. *Eur Respir J*. 2006;28(1):16-23.
88. Döscher G. Evaluation eines neuen Testverfahrens zur Diagnose einer Infektion mit Mycobacterium tuberculosis. *Med. Dis. Lübeck* 2007.
89. Kobashi Y, Obase Y, Fukuda M, Yoshida K, Miyashita N, Fujii M et al. Usefulness of QuantiFERON TB-2G, a diagnostic method for latent tuberculosis

infection, in a contact investigation of health care workers. *Intern Med*. 2007;46(18):1543-9.

90. Hill PC, Brookes RH, Fox A, Jackson-Sillah D, Jeffries DJ, Lugos MD et al. Longitudinal assessment of an ELISPOT test for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS Med*. 2007;4(6):e192.
91. Arend SM, Thijsen S, Leyten E, Bouwman J, Franken W, Koster B et al. Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:618-27.
92. Goletti D, Stefania C, Butera O, Amicosante M, Ernst M, Sauzullo I et al. Accuracy of immunodiagnostic tests for active tuberculosis using single and combined results: A multicenter TBNET study. *PLoS One*. 2008;3(10):e3417.
93. Liebeschuetz S, Bamber S, Ewer K, Deeks J, Pathan AA, Lalvani A. Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T-cell-based assay: a prospective cohort study. *Lancet*. 2004;364(9452):2196-203.
94. 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(8):529-36.
95. Lee JY, Choi HJ, Park IN, Hong SB, Oh YM, Lim CM et al. Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur Respir J*. 2006;28(1):24-30.
96. Goletti D, Carrara S, Vincenti D, Saltini C, Rizzi EB, Schinina V et al. Accuracy of an immune diagnostic assay based on RD1 selected epitopes for active tuberculosis in a clinical setting: a pilot study. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(6):544-50.
97. Ferrara G, Losi M, D'Amico R, Roversi P, Piro R, Meacci M 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(9519):1328-34.
98. Kang YA, Lee HW, Hwang SS, Um SW, Han SK, Shim YS et al. Usefulness of whole-blood interferon-gamma assay and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Chest*. 2007;132:959-65.
99. Janssens JP, Roux-Lombard P, Perneger T, Metzger M, Vivien R, Rochat T. Quantitative scoring of an interferon-gamma assay for differentiating active from latent tuberculosis. *Eur Respir J*. 2007;30:722-8.
100. Detjen AK, Keil T, Roll S, Hauer B, Mauch H, Wahn U et al. Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2007;45:322-8.
101. Dominguez J, Ruiz-Manzano J, De Souza-Galvao M, Latorre I, Mila C, Blanco S et al. Comparison of two commercially available gamma interferon blood tests for immunodiagnosis of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15:168-71.
102. Soysal A, Torun T, Efe S, Gencer H, Tahaoglu K, Bakir M. Evaluation of cut-off values of interferon-gamma-based assays in the diagnosis of *M. tuberculosis* infection. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008;12:50-6.
103. Dosanjh DP, Hinks TS, Innes JA, Deeks JJ, Pasvol G, Hackforth S et al. Improved diagnostic evaluation of suspected tuberculosis. *Ann Intern Med*. 2008;148:325-36.
104. Hill PC, Brookes RH, Fox A, Fielding K, Jeffries DJ, Jackson-Sillah D et al. Large-scale evaluation of enzyme-linked immunospot assay and skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection against a gradient of exposure in The Gambia. *Clin Infect Dis*. 2004;38(7):966-73.

105. Hill PC, Brookes RH, Adetifa IM, Fox A, Jackson-Sillah D, Lugos MD et al. Comparison of enzyme-linked immunospot assay and tuberculin skin test in healthy children exposed to *Mycobacterium tuberculosis*. *Pediatrics*. 2006;117(5):1542-8.
106. Rieder HL. Theoretische und praktische Überlegungen bei Anwendung des Tuberkulintests. *Pneumologie*. 1997;51(11):1025-32.
107. Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, Niemann S, Nienhaus A. Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(10):1164-1170.
108. Richeldi L, Ewer K, Losi M, Hansell DM, Roversi P, Fabbri LM et al. Early diagnosis of subclinical multidrug-resistant tuberculosis. *Ann Intern Med*. 2004;140(9):709-13.
109. Harada N, Nakajima Y, Higuchi K, Sekiya Y, Rothel J, Mori T. Screening for tuberculosis infection using whole-blood interferon-gamma and Mantoux testing among Japanese healthcare workers. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006;27(5):442-8.
110. Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med*. 2007;146(5):340-54.
111. Vilaplana C, Ruiz-Manzano J, Gil O, Cuchillo F, Montané E, Singh M et al. The tuberculin skin test increases the responses measured by T cell interferon-gamma release assays. *Scand Journal Immunol*. 2008;67(6):610-7.
112. Beffa P, Zellweger A, Janssens JP, Wrighton-Smith P, Zellweger JP. Indeterminate test results of T-SPOT.TB performed under routine field conditions. *Eur Respir J*. 2008;31(4):842-6.
113. Pai M, Lewinsohn DM. Interferon-gamma assays for tuberculosis: is anergy the Achilles' heel? *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(5):519-21.
114. Doherty TM, Demissie A, Menzies D, Andersen P, Rook G, Zumla A. Effect of sample handling on analysis of cytokine responses to *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples using ELISA, ELISPOT and quantitative PCR. *J Immunol Methods*. 2005;298(1-2):129-41.
115. van Zyl-Smit RN, Zwerling A, Dheda K, Pai M. Within-subject variability of interferon-gamma assay results for tuberculosis and boosting effect of tuberculin skin testing: a systematic review. *PLoS One*. 2009;4(12):e8517.
116. Canadian Tuberculosis Committee. Updated recommendations on interferon gamma release assays for latent tuberculosis infection. An Advisory Committee Statement (ACS). *Can Commun Dis Rep*. 2008;34(ACS-6):1-13.
117. Hart PD, Sutherland I. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *Br Med J*. 1977;2(6082):293-5.
118. IUTLD. Efficacy of various durations of isoniazid preventive therapy for tuberculosis: five years of follow-up in the IUAT trial. International Union Against Tuberculosis Committee on Prophylaxis. *Bull World Health Organ*. 1982;60(4):555-64.
119. 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(12):1181-3.
120. Al-Attiyah 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(3):249-56.

121. Ruhwald M, Petersen J, Kofoed K, Nakaoka H, Cuevas LE et al. Improving T cell assays for the diagnosis of latent TB infection: Potential of a diagnostic test based on IP-10. *PLoS One*. 2008;3(8):e2858.
122. Berktaş M, Guducuoglu H, Bozkurt H, Onbasi KT, Kurtoglu MG et al. Change in serum concentrations of interleukin-2 and interferon-gamma during treatment of tuberculosis. *J Int Med Res*. 2004;32:324-30.
123. Biselli R, Mariotti S, Sargentini V, Sauzullo I, Lastilla M, Mengoni F et al. Detection of interleukin-2 in addition to interferon-gamma discriminates active tuberculosis patients, latently infected individuals, and controls. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(8):1282-4.
124. Lopez B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol*. 2003;133(1):30-7.
125. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity*. 1995;2(6):561-72.
126. Egen JG, Rothfuchs AG, Feng CG, Winter N, Sher A, Germain RN. Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. *Immunity*. 2008;28(2):271-84.
127. Algood HM, Lin PL, Flynn JL. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2005;41:189-93.
128. Stenger S. Immunological control of tuberculosis: role of tumour necrosis factor and more. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:24-8.
129. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor  $\alpha$ -neutralizing agent. *N Engl J Med*. 2001;345(15):1098-104.
130. Gomez-Reino JJ, Carmona L, Valverde VR, Mola EM, Montero MD. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report. *Arthritis Rheum*. 2003;48(8):2122-7.
131. Wolfe F, Michaud K, Anderson J, Urbansky K. Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy. *Arthritis Rheum*. 2004;50(2):372-9.
132. Engele M, Stoessel E, Castiglione K, Schwerdtner N, Wagner M, Bolcskei P et al. Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2002;168(3):1328-37.

## 7. Anhang

### Fragebogen zur Tuberkulose-Umgebungsuntersuchung

Datum:

Name:

Vorname:

Geburtsdatum:

Geburtsland:

Geschlecht: ☐ männlich ☐ weiblich

Schule:

Klasse:

☐ Schüler/-in ☐ Lehrer/-in ☐ Sonstige: \_\_\_\_\_

1. Wurdest du / wurden Sie in der Vergangenheit gegen Tuberkulose geimpft (BCG-Impfung)?

☐ ja (im Jahr \_\_\_\_)

☐ Nein

☐ unbekannt

2. Hattest du / hatten Sie in der Vergangenheit wissentlich Kontakt zu einem anderen Menschen mit ansteckender Lungentuberkulose (vor dem Kontakt zum infizierten Lehrer)?

☐ ja (im Jahr \_\_\_\_)

☐ nein

☐ unbekannt

3. Wurde bei dir / bei Ihnen schon einmal ein Tuberkulose-Hauttest durchgeführt?

☐ ja (im Jahr \_\_\_\_)

☐ nein

☐ unbekannt

Falls ja:

- Durch wen wurde die Untersuchung durchgeführt? \_\_\_\_\_

- Hattest du / hatten Sie bei diesem Test eine positive Hautreaktion?

☐ ja

☐ nein

☐ unbekannt

4. Wurde bei dir / bei Ihnen schon einmal ein Röntgenbild der Lungen angefertigt?

☐ ja (im Jahr \_\_\_\_)

☐ nein

☐ unbekannt

Falls ja:

- Durch wen wurde die Untersuchung durchgeführt? \_\_\_\_\_

- Welches Ergebnis hatte die Röntgenuntersuchung? \_\_\_\_\_

5. Wurdest du / wurden Sie selbst schon einmal mit Tuberkulosemedikamenten behandelt?

☐ ja (im Jahr \_\_\_\_)

☐ nein

☐ unbekannt

6. Wie viele Stunden pro Woche hattest du / hatten Sie Kontakt zum erkrankten Lehrer (im Zeitraum von Anfang März bis Ende Oktober)?

Etwa \_\_\_\_ Zeitstunden pro Woche.

7. Leidest du / leiden Sie an einer chronischen oder akuten Erkrankung?

☐ ja, \_\_\_\_\_ seit \_\_\_\_

☐ nein

8. Nimmst du / nehmen Sie regelmäßig Medikamente ein?

☐ ja, \_\_\_\_\_

☐ nein

9. Weitere Anmerkungen: \_\_\_\_\_

## **8. Danksagung**

Dieses Kapitel enthält persönliche Daten. Es ist daher nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

## **9. Lebenslauf**

Dieses Kapitel enthält persönliche Daten. Es ist daher nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.