

# Diagnostik der latenten Tuberkulose im neuen Millennium

Matthias Hoffmann<sup>a</sup>, Pietro Vernazza<sup>a</sup>, Walter Fierz<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Fachbereich Infektiologie,  
Departement Innere Medizin,  
Kantonsspital St. Gallen

<sup>b</sup> Institut für klinische Mikrobiologie  
und Immunologie,  
Kanton St. Gallen

Korrespondenz:  
PD Dr. med. Pietro Vernazza  
Leitender Arzt  
Fachbereich Infektiologie/  
Spitalhygiene  
Departement Innere Medizin  
Kantonsspital, Haus 22  
Rorschacherstrasse 95  
CH-9007 St. Gallen

[Pietro.Vernazza@kssg.ch](mailto:Pietro.Vernazza@kssg.ch)

Die WHO geht davon aus, dass  $\frac{1}{3}$  der Weltbevölkerung mit dem *Mycobacterium tuberculosis* infiziert ist [1]. Am stärksten sind die Entwicklungsländer betroffen. Durch die zunehmende Migration werden jedoch Tuberkulosefälle in den westlichen Ländern wieder häufiger. In der Schweiz betreffen >50% der jährlich neu diagnostizierten Tuberkulosen Immigranten aus Gebieten mit einer hohen Tuberkuloseprävalenz [2]. Vor diesem Hintergrund stellt die verlässliche und frühzeitige Diagnosestellung ein vorrangiges Ziel der Tuberkulosekontrolle dar.

Die Diagnose einer latenten Tuberkulose stützt sich heutzutage auf den Tuberkulin-(Mantoux-) Test («tuberculin skin test», TST) [3]. Beim TST wird als Antigen ein gereinigtes Proteingemisch des *M. tuberculosis* («purified protein derivative», PPD) intrakutan injiziert. Die Reaktion des Immunsystems wird anschliessend als Induration in Millimetern abgelesen. Der Test weist eine Anzahl Nachteile auf, welche besonders in Entwicklungsländern zum tragen kommen:

– Um das Testresultat ablesen zu können, ist eine zweite Arztvisite notwendig.

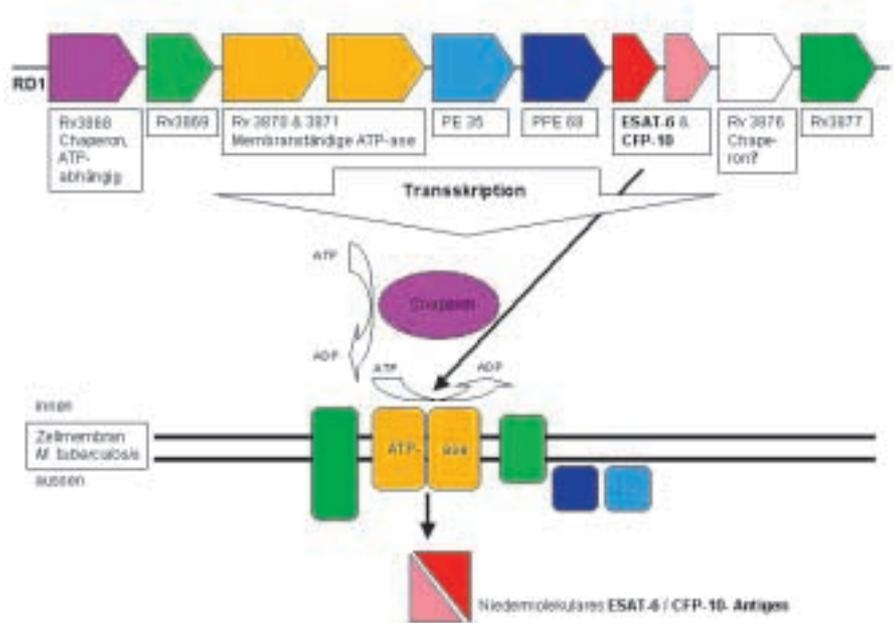
- Die Durchführung wie auch das Ablesen des TST ist untersucherabhängig und daher nicht sicher reproduzierbar.
- Der TST zeigt Kreuzreaktionen mit Umgebungsmykobakterien und der Bacille-Calmette-Guérin-(BCG-)Impfung mit dem *Mycobacterium-bovis*-Impfstamm (verminderte Spezifität).
- Bei immunsupprimierten Patienten (insbesondere im Rahmen von HIV-Infektionen) und im Stadium der akuten aktiven Tuberkuloseerkrankung kann der Tuberkulintest falsch negativ ausfallen (verminderte Sensitivität).

Vor diesem Hintergrund muss die Entwicklung eines sensitiveren und spezifischeren Tests zur Diagnostik der latenten Tuberkulose ein vorrangiges Ziel sein.

Die modernen Methoden zur Detektion der erregerspezifischen zellulären Immunantwort eröffnen neue Wege in der Tuberkulosedagnostik. T-Lymphozyten mit einer Spezifität für die *M. tuberculosis*-Antigene ESAT-6 («early secretory antigen target 6») und CFP-10 («culture filtrate protein 10»), eignen sich zur

## Abbildung 1.

Schematische Darstellung des RD1 («region of deletion 1»)-Genomabschnitts des *M. tuberculosis* mit den neun kodierten Genprodukten und ihrer Funktion. Die Gene der RD1 gingen im Zuge der Attenuierung der BCG-Impfung verloren. Auf diesem Genabschnitt werden die sekretorischen Proteine ESAT-6 und CFP-10 kodiert, deren Funktion noch unbekannt ist. Sie treten früh im Verlauf der Tuberkuloseinfektion auf und stellen einen Virulenzfaktor dar. Sie induzieren *in* und *ex vivo* eine starke Immunantwort der T-Lymphozyten. Die flankierenden Gene kodieren für ein Sekretionssystem, welches für die Ausschleusung der ESAT-6- und CFP-10-Proteine benötigt wird. Diese umfassen eine membranständige ATP-ase (Rv 3870 & 3871) sowie zwei Transmembranproteine (Rv 3869 & 3877), welche wahrscheinlich zusammen den ATP-abhängigen Sekretionsapparat bilden. PE und PPE sind möglicherweise als variable Oberflächenantigene. Ein ebenfalls ATP-abhängiges Chaperon (Rv 3868) stabilisiert wahrscheinlich ESAT-6 und CFP-10 intrazellulär als Heterodimer. Ein weiteres vermutetes Chaperon (Rv 3876) verhindert möglicherweise Protein-Protein-Interaktionen (adaptiert nach [13]).



**Abbildung 2.**

Nachweis spezifischer aktivierter T-Lymphozyten nach Stimulation mit ESAT-6 und CFP-10 mittels «enzyme linked immunospot» (ELISPOT).

(A) Eine ELISPOT-Platte besteht aus 96 Wells. ❶ Vergrößerung eines Wells und schematische Darstellung im Aufriss.

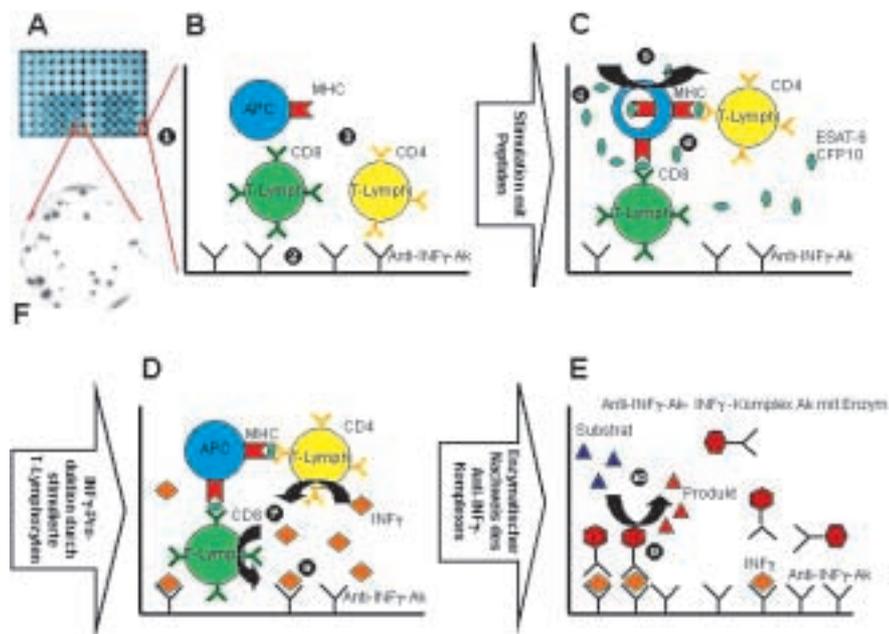
(B) Die Wells sind mit am Boden haftenden Anti- $\text{INF}\gamma$ -Antikörpern ❷ versehen («precoated»). Die mononukleären Zellen (darunter antigenpräsentierende Zellen APC und CD4- und CD8-Lymphozyten) werden aus dem Vollblut separiert und anschliessend auf die Platte gegeben ❸.

(C) Anschliessend werden die ESAT-6- bzw. CFP-10-Peptide ❹ zur Stimulation der T-Lymphozyten beigegeben. Diese werden – zumindest zum Teil – durch die APC prozessiert ❺ und anschliessend mittels des MHC den T-Lymphozyten präsentiert ❻.

(D) Erkennt einer der T-Lymphozyten das präsentierte Antigen ESAT-6 bzw. CFP-10, so wird dieser stimuliert und beginnt, unter anderen Zytokinen v.a.  $\text{INF}\gamma$  ❷ zu produzieren. Das von den stimulierten T-Lymphozyten sezernierte  $\text{INF}\gamma$  wird gleich nach der Sekretion von den Anti- $\text{INF}\gamma$ -Antikörpern ❷ gebunden, so dass keine grössere Diffusion stattfinden kann.

(E) In einem letzten Schritt werden ein Enzym gebundene Antikörper ❸, welche gegen ein zweites Epitop des  $\text{INF}\gamma$  gerichtet sind, zugegeben. Diese binden an das  $\text{INF}\gamma$ , das durch den mit dem Well verbundenen ersten Anti- $\text{INF}\gamma$ -Antikörper am Ort seiner Produktion fixierte wurde. Dadurch wird ein enzymatischer Nachweis ❿ der  $\text{INF}\gamma$ -Produktion durch die T-Lymphozyten möglich.

(F) Da die Diffusion des  $\text{INF}\gamma$  eingeschränkt ist, entspricht bei der Auswertung jeder Spot einer spezifisch gegen die Antigene ESAT-6 respektive CFP-10 gerichteten T-Zelle.



Diagnostik der latenten Tuberkulose. ESAT-6 und CFP-10 sind zwei auf der RD1 («region of deletion 1»)-Region kodierte Proteine. RD1 ist eine 9 Gene umfassende Region, in der die Virulenzfaktoren ESAT-6 und CFP-10 kodiert, deren Funktion bislang noch unklar ist. Sie treten früh während einer *M. tuberculosis*-Infektion auf und werden durch einen ebenfalls auf der RD1 kodierten Sekretionsapparat ausgeschieden (Abb. 1). Die Immunantwort gegen ESAT-6 und CFP-10 ist massgeblich an der Entwicklung einer protektiven Immunität gegenüber *M. tuberculosis* beteiligt [4]. Im attenuierten *M. tuberculosis*-Stamm, den Calmette und Guérin anfangs des zwanzigsten Jahrhunderts zur Entwicklung der BCG-Impfung verwendeten, ging RD1 verloren [5, 6].

*Lalvani* und seine Gruppe aus Oxford entwickelten ein Testverfahren, das auf dem *ex vivo*-Nachweis spezifischer aktivierter Lymphozyten mittels ELISPOT («enzyme linked immunospot») basiert [7–11]. Dabei werden aus dem Vollblut isolierte Lymphozyten mit rekombinanten ESAT-6- und CFP-10-Peptiden stimuliert. Antigenspezifische T-Zellen erkennen die Peptide, was im richtigen MHC-Kontext zu einer intrazellulären Interferon- $\gamma$ -Produktion führt. Diese Zytokinantwort wird semi-quantitativ gemessen (Abb. 2). Da sowohl ESAT-6 als auch CFP-10 in den meisten Umgebungsmykobakterien und im BCG-Impfstamm fehlen, sind Kreuzreaktionen weniger häufig und es wird im Vergleich zum TST eine bessere Spezifität erreicht. Kreuzreaktionen mit RD1-

**Tabelle 1. Wertigkeit des ELISPOT-basierten Tuberkulosestests mittels «enzyme linked immunospot» (ELISPOT). Nachweis ESAT-6/CFP-10 reaktiver T-Lymphozyten in der Diagnostik der aktiven und latenten Tuberkulose.**

Aktive Tuberkulose	Sensitivität	Spezifität	Ag <sup>1</sup> und Referenz
HIV-negative Patienten (n = 96) Gruppe mit Kultur-positiver TB Vergleichsgruppe ohne TB in Gebiet mit tiefer TB-Prävalenz (UK)	96%	92%	ESAT-6 [8]
HIV-positive Patienten (n = 39) Gruppe mit Kultur-positiver TB Vergleichsgruppe ohne TB in Gebiet mit hoher TB-Prävalenz (Sambia)	>90%	nicht berechenbar	ESAT-6 + CFP-10 [10]
HIV-negative Patienten (n = 50) mit Kultur-positiver TB in Gebiet mit hoher TB-Prävalenz (Indien)	80%	nicht berechenbar	ESAT-6 [9]
Latente Tuberkulose-Infektion	Korrelation zu TB-Exposition: OR <sup>2</sup> (p-Wert)		Ag <sup>1</sup> und Referenz
	ELISPOT	TST	
Gebiet mit tiefer TB-Prävalenz (UK) Kontakte von Kultur-positivem Patienten (n = 50)	9,0 (p = 0,001)	1,9 (p = 0,05)	ESAT-6 [7]
Gebiet mit tiefer TB-Prävalenz (UK) Kontakte von Kultur-positivem Patienten (n=535)	2,78 (p <0,0001) <sup>3</sup>	2,33 (p <0,0001) <sup>3</sup>	ESAT-6 + CFP-10 [11]

<sup>1</sup> Für die Durchführung des ELISPOT verwendetes Antigen («early secretory antigen target 6» (ESAT-6) und/oder «culture filtrate protein 10» (CFP-10).

<sup>2</sup> Odds-Ratio eines positiven Tests bei tuberkuloseexponierten Personen.

<sup>3</sup> Der Vergleich des ELISPOT-basierten Tuberkulosestests mit dem TST mittels logistischer Regression der Odds-Ratios anhand der Tuberkuloseexposition zeigte einen signifikanten Unterschied (p = 0,03).

tragenden Mykobakterien können jedoch nicht verhindert werden [12]. Im Gegensatz zum TST, bei welchem das Resultat der abgelaufenen Immunreaktion als Hautinduration gemessen wird, werden im ELISPOT-basierten Tuberkulosestest die ersten Schritte der Immunreaktion nachgewiesen. Damit ist dieser Test weitgehend unabhängig von sekundär ablaufenden Immunreaktionen und verspricht daher, insbesondere bei immunsupprimierten Personen, eine grössere Sensitivität.

Der ELISPOT-basierte Tuberkulosestest wurde in klinischen und epidemiologischen Settings sowohl in der Diagnostik der aktiven als auch latenten Tuberkulose evaluiert (Tab. 1) [7–11]. Besteht in der Diagnostik der aktiven Tuberkulose in Form des kulturellen Erregernachweises ein Goldstandard, ist in der Diagnostik der latenten Tuberkulose kein solcher Goldstandard verfügbar. Ein neuer Test kann einzig gegen den TST verglichen werden, der mangels einer besseren Alternative als Referenz gilt. Vergleiche zwischen den prozentualen Anteilen reaktiver Patienten in beiden Testverfahren sind wenig aussagekräftig. Sie ermöglichen einzig den Nachweis der fehlenden Kreuzreaktion der im ELISPOT-basierten Tuberkulosestest

verwendeten Antigene ESAT-6 und CFP-10 mit der BCG-Impfung [8, 9].

Um dennoch Aussagen über die Tauglichkeit des ELISPOT-basierten Tuberkulosestests in der Diagnostik der latenten Tuberkulose machen zu können, mussten *Lalvani* und seine Gruppe einen möglichst realitätsgetreuen Goldstandard definieren. Sie nahmen als Marker der Infektionswahrscheinlichkeit die Exposition gegenüber einem kulturpositiven symptomatischen (hustenden) Indexfall an. Unter Berücksichtigung der Expositionsdauer, der räumlichen Distanz, der Raumeigenschaften (Lüftung) etc. bildeten sie unterschiedliche Risikogruppen. Diese epidemiologischen Daten dienen *Lalvani* und seiner Gruppe als Expositionsmarker [7, 11]. Die Korrelation eines positiven Testresultats mit der anamnestisch erhobenen und nach Risiko abgestuften Tuberkuloseexposition gelang mit beiden Testverfahren (Tab. 1). Das ELISPOT-basierte Tuberkulosestestverfahren war jedoch signifikant sensitiver (p = 0,03) [11].

Das ELISPOT-basierte Tuberkulosestestverfahren eröffnet neue Perspektiven in der Diagnostik der latenten Tuberkulose – insbesondere bei immunkompromittierten Personen (v.a.

HIV-Patienten). Für die Durchführung des Tests ist jedoch ein entsprechend ausgestattetes Labor notwendig. Die Verlässlichkeit, Wertigkeit und Anwendbarkeit des Tests in der

Routinediagnostik muss sich erst noch zeigen. Längerfristig kann die Bedeutung des neuen Testverfahrens nur in grossen epidemiologischen Studien beurteilt werden.

## Literatur

- 1 Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus Statement: Global Burden of Tuberculosis: Estimated incidence, prevalence and mortality by country: WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA 1999;282:677-86.
- 2 Bundesamt für Gesundheit BAG. Tuberkulose in der Schweiz 1999 bis 2000. BAG Bulletin 2002;9:168-72.
- 3 Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Latent tuberculosis infection. N Engl J Med 2002;347:1860-6.
- 4 Pym AS, Brodin P, Majlessi L, Brosch R, Demangel C, et al. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. Nature Med 2003;9:533-9.
- 5 Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. Mol Microbiol 2002;46:709-12.
- 6 Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, et al. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guérin attenuation. J Infect Dis 2003;187:117-23.
- 7 Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. Lancet 2001;357:2017-21.
- 8 Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, et al. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. Am J Respir Crit Care Med 2001;163:824-8.
- 9 Lalvani A, Nagvenkar P, Udawadia Z, Pathan AA, Wilkinson KA, et al. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. J Infect Dis 2001;183:469-77.
- 10 Chapman ALN, Munkanta M, Wilkinson KA, Pathan AA, Ewer K, et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells. AIDS 2002;16:2285-93.
- 11 Ewer K, Deeks J, Alvarez L, Bryant G, Waller S, et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. Lancet 2003;361:1168-73.
- 12 Arend SM, van Meijgaarden KE, de Boer K, Cerda de Palou E, van Soolingen D, et al. Tuberculin skin testing and in vitro T cell responses to ESAT-6 and culture filtrate protein 10 after infection with *Mycobacterium marinum* or *M. kansasii*. J Inf Dis 2002;186:1797-807.
- 13 Young DB. Building a better tuberculosis vaccine. Nature Med 2003;9:503-4.