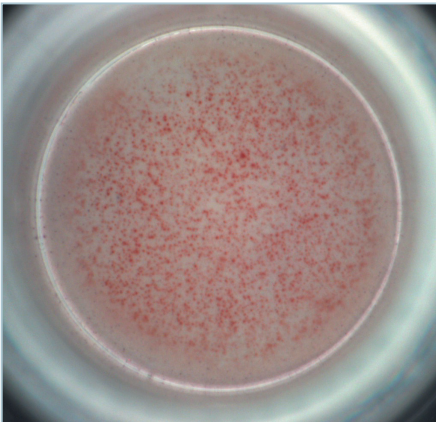


TB-EliSpot

Mendel-Mantoux-Test aus der Retorte

Prof. Dr. med. H.-P. Seelig



Kavität einer Mikrotiterplatte. Die Farbspots markieren antigenspezifische Interferon-sezernierende T-Zellen.



Medizinisches Versorgungszentrum
Labor Prof. Seelig

Kriegsstraße 99 · 76133 Karlsruhe
Telefon: 0721 850000 · www.laborseelig.de

Nach Einschätzungen der WHO ist ein Drittel der Weltbevölkerung mit *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) infiziert. Pro Jahr wird mit 8 bis 9 Mio. Neuerkrankungen und mit etwa 2 Mio. Todesfällen gerechnet. Am stärksten hiervon betroffen sind Entwicklungsländer. Infolge der zunehmenden Immigration aus diesen Hochprävalenzgebieten steigt in den westlichen Ländern das Risiko, sich mit *M. tuberculosis* und in zunehmendem Maße auch mit therapieresistenten Keimen zu infizieren. Etwa die Hälfte der Patienten mit einer in Deutschland diagnostizierten Tuberkulose (TB) wurde im Ausland geboren (11 % Russland, Baltikum). Für eine effektive Tuberkulosekontrolle ist daher eine schnelle und verlässliche Diagnostik auch der latenten *M. tuberculosis*-Infektionen (LTBI) dringend erforderlich. Etwa 10 % der immunkompetenten Personen mit LTBI entwickeln eine aktive Tuberkulose, am häufigsten Kinder und jugendliche Erwachsene.

Für die Diagnostik einer LTBI sind serologische Tests wegen der allgemein schwachen humoralen Immunantwort gegen Mykobakterien ungeeignet. Wesentlich stärker ausgeprägt sind dagegen die 6 bis 8 Wochen nach einer Infektion nachweisbaren zellulären Immunreaktionen. Auf ihnen basieren die zu Beginn des letzten Jahrhunderts entwickelten Tuberkulin-Hauttests (Mendel, 1903; Mantoux, 1908) mit dem von Robert Koch erstmals 1890 beschriebenen Tuberkulin. Die intradermale Injektion von Tuberkulin führt bei sensibilisierten, d. h. mit Mykobakterien infizierten Personen innerhalb von 72 Stunden zu einer infiltrativen Entzündung (Induration) an der Inokulationsstelle.

Tuberkulintests sind nicht spezifisch

Gereinigtes Tuberkulin bzw. der internationale Standard, das Purified Protein Derivative (PPD-S), wird durch fraktionierte Fällungen aus Überständen von *M. tuberculosis*-Kulturen hergestellt und enthält über 200 unterschiedliche mykobakterielle Antigene, die sich zum Teil auch bei den anderen Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes, z. B. dem *M. bovis* BCG-Stamm (Bacille Calmette-Guérin) und in mykobakteriellen Umgebungskeimen (nicht tuberkulöse Mykobakterien, NTM) wiederfinden. Infektionen mit mykobakteriellen Umweltkeimen können daher ebenso positive Reaktionen auslösen wie eine dem Tuberkulintest bis zu mehr als 15 Jahren vorausgegangene BCG-Impfung. Letztere stört die Diagnostik besonders, da ein Großteil der Weltbevölkerung, vor allem in den Geburtsländern vieler Immigranten, mit BCG vakziniert wurde. Auch in Deutschland, wo die BCG-Impfung seit 1998 nicht mehr empfohlen wird, ist bei Jugendlichen

und jungen Erwachsenen noch mit solchen Störreaktionen zu rechnen. Die klinische Aussagekraft des Tuberkulintests wird daher wesentlich von der Prävalenz der Tuberkuloseinfektionen im Umfeld der getesteten Personen mitbestimmt. Bei hoher Infektionsprävalenz ist eine positive Reaktion eher einer Infektion mit dem *M. tuberculosis*-Komplex zuzuschreiben als bei niedriger Infektionsprävalenz, wo es sich eher um die Folge von Infektionen mit nicht tuberkulösen Mykobakterien handeln könnte.

Bei angeborenen, erworbenen oder therapiebedingten Immundefekten, bei Virusinfektionen wie infektiöser Mononukleose, Masern, Röteln, Windpocken, schweren grippalen Infekten, Schutzimpfungen (Masern, Röteln, Mumps), lymphatischen Systemerkrankungen (M. Hodgkin) oder Sarkoidose kann der Tuberkulintest falsch negativ ausfallen ebenso wie auch bei Kleinkindern oder bei bestimmten Formen aktiver Tuberkulosen (Miliartuberkulose, Meningitis tuberculosa).

EliSpot-Assay – ein neuer *in vitro* Test

Die Nachteile des Tuberkulintests veranlassten die Suche nach spezifischeren, sensitiveren und wenn möglich einfacheren diagnostischen Verfahren zur Erkennung mykobakterieller Infektionen. Auch die plötzliche Einstellung der Produktion des einzigen in Deutschland für den Mendel-Mantoux-Test verwendeten Tuberkulins und die dadurch entstandene Versorgungslücke eines wichtigen diagnostischen Reagenz (Therapieentscheidung, präventive Chemotherapie bei LTBI) hat das Interesse an Alternativmethoden verstärkt.

Die in den letzten 25 Jahren gewonnenen Erkenntnisse über die Molekularbiologie zellulärer Immunreaktionen ermöglichten die Entwicklung von *in vitro* Testverfahren auf der Basis des Lymphozytentransformationstests, mit denen *M. tuberculosis*-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Von diesen Verfahren hat sich bisher der EliSpot-Assay als verlässliche Alternative in der Labor diagnostik durchgesetzt. Zelluläre Reaktionspartner sind die aus dem Venenblut isolierten mononukleären Zellen (Monozyten, B-Lymphozyten, CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten), die in den Kavitäten von Mikrotiterplatten durch die mykobakteriellen Antigene ESAT-6 und/oder CFP-10 transformiert werden.

ESAT-6 und CFP-10 ersetzen Tuberkulin

Der attenuierte *M. bovis* BCG-Stamm wurde nach 230 seriellen Passagen von *M. bovis* in Flüssigkulturen erhalten. Sein mit der Attenuierung verbundener Virulenzverlust beruht auf Gendeletionen in den sog. differierenden Genregionen (RD, region of difference). Die RD1-Region, ein 9,5 kb großes Segment mit 9 Genen (Abbildung 1) kommt in allen virulenten Labor- und Humanisolaten von *M. tuberculosis* und *M. bovis*, nicht aber in den

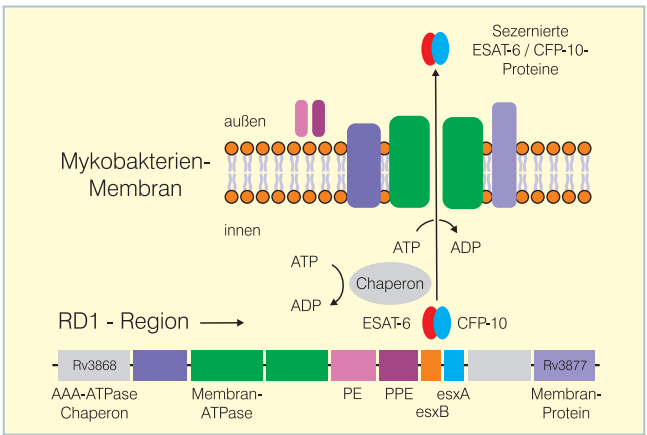


Abbildung 1

RD1 (region of difference 1)-Genomabschnitt von *M. tuberculosis* auf dem die sekretorischen Proteine ESAT-6 und CFP-10 codiert werden. Die flankierenden Gene codieren ein ATP-abhängiges Sekretionssystem, das für die Ausschleusung der ESAT-6- und CFP-10-Proteine aus den Bakterien benötigt wird. PE und PPE sind möglicherweise 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.

M. bovis BCG-Stämmen vor. Wird dem *M. tuberculosis* dieses Gensegment entfernt, verliert es, wie tierexperimentell gezeigt wurde, seine Virulenz.

Die auf dem RD1-Segment liegenden Gene *esxB* und *esxA* codieren das 6 kDa große Early Secretory Antigenic Target (ESAT-6, 1995) und das 10 kDa große Culture Filtrate Protein (CFP-10, 1998), zwei sekretorische Proteine unbekannter Funktion, die *in vivo* und *ex vivo* eine starke Immunantwort vom Th1-Typ auslösen. ESAT-6 und CFP-10 werden von *M. tuberculosis*, *M. bovis* und *M. africanum* nicht aber von BCG-Stämmen und mykobakteriellen Umweltkeimen mit Ausnahme von *M. kansasii*, *M. szulgai* (Lungen-, Haut- und Lymphknotenaffektionen) und *M. marinum* (Schwimmbadgranulom) exprimiert. Mögliche Kreuzreaktionen beschränken sich auf die benannten Keime. Falsch positive Reaktionen nach BCG-Impfung oder nach Infektionen mit den meisten nicht tuberkulösen Mykobakterien sind bei der Verwendung dieser Antigene daher nicht mehr zu erwarten.

Immunpathologie

Tuberkulintest und EliSpot-Assay basieren auf analogen initialen immunpathologischen Reaktionen. Beim Tuberkulintest werden die Tuberkulinproteine am Ort der Injektion von Langerhans- und

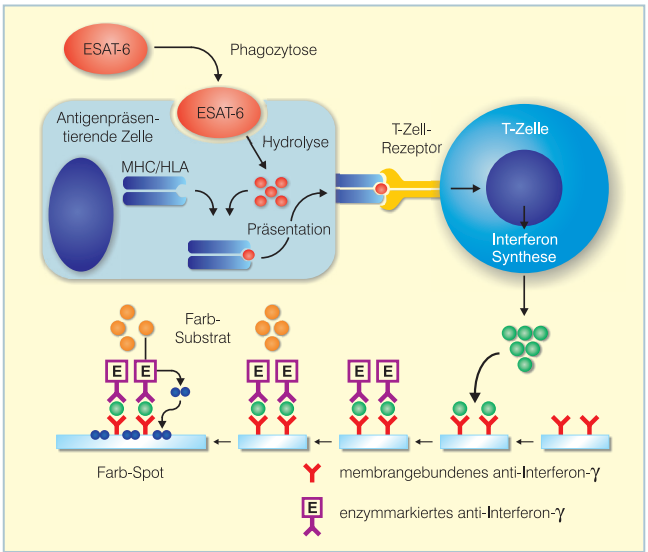


Abbildung 2

Antigenverarbeitung und -präsentation durch Phagozyten. Die Erkennung der antigenen Peptidfragmente durch Rezeptoren sensibilisierter T-Gedächtniszellen stimuliert die Interferon- γ -Sekretion. Immunochemischer Nachweis von Interferon- γ am Ort der Sekretion.

anderen Zellen des mononukleären Phagozytensystems (antigen-präsentierenden Zellen, APZ) phagozytiert. Beim EliSpot-Assay werden die dem Testansatz zugegebenen Proteine ESAT-6 und/oder CFP-10 von den aus dem Blut isolierten APZ (Monozyten) phagozytiert. In beiden Fällen werden die phagozytierten Proteine intrazellulär in kleine Peptide von 10 - 30 Aminosäuren gespalten, die dann zusammen mit MHC-Molekülen (HLA-Antigenen) auf der Außenseite der Zellmembranen exprimiert und sensibilisierten T-Lymphozyten präsentiert werden (Abbildung 2). Im Falle einer zellulären Sensibilisierung reagieren die antigenspezifischen T-Zell-Rezeptoren der T-Gedächtniszellen mit den präsentierten MHC-Peptidkomplexen wodurch die Synthese und Sekretion von Interferon- γ stimuliert wird, das beim Tuberkulintest die örtliche Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine auslöst, die dann die infiltrative Entzündung in Gang setzen. Das beim Eli-Spot-Assay in hoher Konzentration von den T-Zellen sezernierte Interferon- γ wird noch am Ort der Sekretion von membranfixierten Interferon- γ -Antikörpern gebunden und dann mit einem zweiten, enzymmarkierten Interferon- γ -Antikörper in einer immunochemischen Farbreaktion nachgewiesen. Jeder auf der Membran sichtbare Farbfleck markiert eine antigenspezifische T-Zelle (spot forming cells; siehe Titelbild).

EliSpot-Assay oder Tuberkulintest?

Aktive Tuberkulosen: Bei Erwachsenen mit kulturbestätigten aktiven Tuberkulosen zeigte der EliSpot-Assay eine Sensitivität von 96 - 100 % bei einer Spezifität von 92 %. Die Sensitivität lag deutlich über der des Tuberkulintests (69 %). Bei Kindern war der EliSpot-Assay ebenfalls sensitiver (70 - 83 %) als der Tuberkulintest (63 %). Auch bei HIV-positiven Erwachsenen (> 95 %) und Kindern (85 %) zeichnet sich der EliSpot-Assay durch eine hohe Sensitivität aus. Sie war bei HIV-positiven Kindern im Vergleich zu HIV-negativen um nur 13 % geringer, während die des Tuberkulintests um 43 % abnahm.

Latente Infektionen: Kontaktpersonen von Patienten mit aktiver Tuberkulose besitzen ein von der Expositionszeit und den räumlichen Verhältnissen mitbestimmtes Risiko einer latenten Infektion. Untersuchungen an solchen Kontaktpersonen zeigten, dass positive Reaktionen im EliSpot-Assay eindeutig mit der Höhe des Infektionsrisikos korrelierten. Einen wichtigen Beitrag zur Beurteilung des Assays lieferten auch Untersuchungen an Kontaktpersonen eines an einer offenen Tuberkulose erkrankten Schülers, die zu einem Tuberkuloseausbruch in einer englischen Schule führte. Hierbei zeigte sich, dass die mit dem Tuberkulintest (Heaf-Test) und die mit dem EliSpot-Assay erhaltenen positiven Reaktionen mit dem Infektionsrisiko-Index korrelierten. In 89 % der Fälle fanden sich übereinstimmende Resultate. Der EliSpot-Assay war aber signifikant ($p=0,03$) sensitiver in der Erkennung latenter Infektionen. Vorausgegangene BCG-Impfungen stören den EliSpot-Assay nicht, positive Reaktionen wurden aber bei Infektionen mit *M. kansasii*, *M. szulgai* und *M. marinum* (RD1-Region, siehe oben) erhalten.

Nach den bisherigen Studien ist der EliSpot-Assay dem Tuberkulintest hinsichtlich der diagnostischen Wertigkeit zumindest ebenbürtig. Seine Vorteile sind:

- ▶ Verbesserte Spezifität (BCG-Impfung, NTM-Infektionen).
- ▶ Hohe Sensitivität (Kinder, Immundefiziente).
- ▶ *In vitro* Test, keine belästigenden Starkreaktionen.
- ▶ Ergebnisse binnen 24 Stunden.
- ▶ Kein zweiter Arztbesuch notwendig.

Längerfristig ist das neue Testverfahren erst nach größeren epidemiologischen Studien zu beurteilen.

Untersuchungsmaterial:

Heparin-Blut-Monovette. Nicht kühlen. Das Material sollte am Tag der Abnahme (Montag bis Donnerstag) im Labor eintreffen (Sensitivitätseinbuße bei Lagerung). Für die Untersuchung werden vitale Blutzellen benötigt.