UNIKLINIK KÖLN
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene

Diagnostik der latenten *Mycobacterium tuberculosis*-Infektion durch Interferon-γ Tests

Klinischer Hintergrund

Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation erkranken weltweit jährlich ca. 9 Millionen Menschen neu an Tuberkulose, darunter knapp die Hälfte an der hoch ansteckenden mikroskopisch positiven Form. Obwohl in Deutschland die Inzidenz trotz eines zu beobachtenden Anstiegs der Erkrankungszahlen in den letzten Jahren mit 7,3 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr 2015 weiterhin niedrig ist, stellt die Tuberkulose wegen der Besorgnis erregenden Zunahme multiresistenter Tuberkulosebakterien (MDR) und extrem resistenter Tuberkulosestämme (XDR) vor allem in Osteuropa und von dort einreisenden Patienten für unser Klinikum ein latentes Problem dar.
Zur Standarddiagnostik der Tuberkulose gehören die Anamnese, Erregernachweis (Mikrokopie, Kultur und Molekularbiologie), bildgebende Verfahren und der Nachweis einer spezifischen zellulären Immunität. Letzterer wird bei anamnestischem Verdacht auf eine Tuberkulose durch einen Tuberkulinhauttest nach Mendel-Mantoux durchgeführt. Dabei werden 2 TU („tuberculin units“) des in Deutschland im September 2005 neuzugelassenen Tuberkulins RT23 des Statens Serum Institute Kopenhagen streng intrakutan injiziert. Die Ablesung erfolgt nach 72 h. Abhängig vom individuellen Infektionsrisiko gelten verschiedene Indurationsdurchmesser als positiver bzw. interventionsbedürftiger Grenzwert.
Als diagnostisches Mittel zum Nachweis einer spezifischen zellulären Immunität stehen außerdem In-vitro-Testverfahren, so genannte Interferon-γ-Freisetzungstests, zur Verfügung. Am IMMIH bieten wir die Bearbeitung des QuantiFERON TB® Gold Plus-Tests (Firma Qiagen) an.

Prinzip

Die Interferon-γ-Tests basieren auf dem gleichen immunologischen Prinzip wie der Tuberkulin- bzw. Mendel-Mantoux-Test. Nach Präsentation von *M. tuberculosis*-Antigenen werden T-Zellen aktiviert und produzieren verschiedene immunmodulatorische Zytokine, darunter v. a. Interferon-γ (IFN-γ). Bei den In-Tube-Testverfahren wird dies *in vitro* durchgeführt. Dazu werden Lymphozyten des peripheren Blutes (ggf. Lymphozyten aus dem Bereich des infizierten Organes) mit rekombinant hergestellten Antigenen von *M. tuberculosis* in Kultur inkubiert und das freigesetzte IFN-γ durch Enzymimmunoassay quantifiziert. Der QuantiFERON-TB® Gold Plus-Test enthält einen Peptidcocktail, welcher die spezifischen Proteine ESAT-6 und CFP-10 simuliert und sensibilisierte T-Lymphozyten in heparinisiertem Vollblut stimuliert. Dabei misst das TB1-Röhrchen vorwiegend die $CD4^+$-Antwort, während das TB2-Röhrchen sowohl für die $CD4^+$- als auch die $CD8^+$-Antwort optimiert ist. Da der Nachweis auf der zellulären Immunität des Probanden basiert, kann er frühestens 8-12 Wochen nach einem fraglichen Kontakt mit den Erregern positiv werden. Eine mitgeführte "Mitogen"-Stimulationskontrolle dient dazu, eine eingeschränkte zelluläre Immunität aufzuzeigen.

Erforderliches Material

Für den QFT® Gold Plus-Test muss Patientenblut in spezielle Blutentnahmeröhrchen (Quantiferon Single Patient Pack) entnommen werden. Diese können Sie über die Apotheke des Klinikum unter der Klinik-SAP-Nummer 225208 beziehen. Das Single Patient Pack umfasst folgende Blutentnahmeröhrchen:
1. Nullkontrolle (grauer Verschluss)
2. Tb-spezifische Antigene 1 „TB1“ (grüner Verschluss)
3. Tb-spezifische Antigene 2 „TB2“ (gelber Verschluss)
4. Mitogen-Kontrolle (violetter Verschluss)

Die Antigene befinden sich in getrockneter Form in der Beschichtung der Innenwand der Röhrchen. Daher müssen die Blutproben sorgfältig mit dem Inhalt des Röhrchens vermischt werden.

Probennahme und –handhabung

1. Nehmen Sie von jedem Patienten je 1 ml venöses Blut in jedes der QFT-Blutentnahmeröhrchen ab. Die schwarze Markierung seitlich der Röhrchen ist die 1 ml Fülllinie. QFT-Röhrchen wurden für 0,8 bis 1,2 ml validiert. Diesen Bereich nicht überschreiten, sonst ist der Test nicht auswertbar! Bei

Verwendung von Butterfly-Nadeln zur Blutentnahme ist mit einem Leerröhrchen sicherzustellen, dass die Schlauchverbindung gefüllt ist, bevor die QFT-Röhrchen aufgesetzt werden.
2. Mischen Sie die Röhrchen durch 10-maliges Umkehren oder durch 5 Sekunden langes Schütteln. Vergewissern Sie sich, dass die gesamte Innenwand des Röhrchens mit Blut benetzt ist.
3. Beschriften Sie die Röhrchen und den Einsendeschein. Auf dem Einsendezettel sind Patientendaten, Abnahmedatum und Uhrzeit zu vermerken.
4. Die Röhrchen müssen schnellstmöglich, spätestens jedoch 16 Stunden nach Blutentnahme zusammen mit dem Einsendeschein im IMMIH eintreffen.
Die Inkubation des Vollblutes wird im IMMIH durchgeführt! Daher muss der Einsender für einen zügigen Transport der Röhrchen und korrekte Lagerung bei Raumtemperatur (zwischen 17°C und 27°C) bis zum Eintreffen im Labor sorgen.

Interpretation

Die Sekretion von Interferon-γ durch die T-Lymphozyten wird mit einem ELISA-Verfahren gemessen und als Einheiten/ml (IU/ml) mitgeteilt. Die Höhe des ermittelten Interferon-γ korreliert nicht mit dem Erkrankungsstadium, der Schwere der Erkrankung oder der Wahrscheinlichkeit der Progression zu einer manifesten Erkrankung, sondern wird lediglich aus Gründen der Befunddokumentation mitgeteilt. Ein positiver QuantiFERON® TB Gold Plus-Test zeigt ebenfalls nicht notwendiger Weise eine aktive Tuberkulose an.

		Algorithmus zur Erstellung der Befundinterpretation (wird im Labor angewandt)			
QuantiFERON TB Gold Plus Ergebnis	**Bericht/Interpretation**	**Null-Kontrolle [IE/ml]**	**TB 1 minus Null [IE/ml]**	**TB 2 minus Null [IE/ml]**	**Mitogen minus Null [IE/ml]**
Negativ	*M. tuberculosis*-Komplex-Infektion NICHT wahrscheinlich	≤ 8,0	< 0,35 oder ≥ 0,35 und < 25% des Nullkontrollwertes		≥ 0,5
Positiv	*M. tuberculosis*-Komplex-Infektion wahrscheinlich	≤ 8,0	≥ 0,35 und ≥ 25% der Nullkontrolle	beliebig	beliebig
			beliebig	≥ 0,35 und ≥ 25% der Nullkontrolle	
unschlüssig	Ergebnisse für Tb-Antigenreaktion unschlüssig	≤ 8,0	< 0,35 oder ≥ 0,35 und < 25% des Nullkontrollwertes		< 0,5
		> 8,0	beliebig		

Da die bei diesem Verfahren eingesetzten Antigene nach bisherigem Kenntnisstand regelmäßig nur bei den Bakterienarten des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex, sowie bei *M. kansasii, M. marinum* und *M. szulgai* vorhanden sind, bei den BCG-Impfstämmen und ubiquitär vorkommenden Mykobakterienarten jedoch fehlen, sind Kreuzreaktionen nach Immunisierung mit letzteren nicht zu erwarten.

Sensitivität und Spezifität sind abhängig von der Prävalenz der Tuberkulose in der untersuchten Population und lagen in Studien im Mittel bei 98% (Spezifität) und 95% (Sensitivität) für das Erkennen einer stattgefundenen Tuberkulose bzw. einer latenten *M. tuberculosis*-Infektion.

Vorteile

- Keine Kreuzreaktion mit BCG oder atypischen Mykobakterien (bisher bekannte Ausnahmen sind: *M. kansasii, M. marinum, M. szulgai*)
- Höhere Spezifität (98%) als Tuberkulin-Teste bei gleicher oder besserer Sensitivität
- Objektivierte und standardisierte Testauswertung
- Einmalige Blutentnahme (Probanden müssen zur Ablesung nicht wieder einbestellt werden)

Nachteile

- Höhere Kosten als Mendel-Mantoux-Test
- Fragliche Beeinflussung des Ergebnisses durch antituberkulöse Chemotherapie
- Verfälschung des Ergebnisses durch Lagerung und Transport der Probe