

Untersuchungen zur Eignung von Interferon-gamma release assays
zum Nachweis von *M. tuberculosis*-reaktiven T-Lymphozyten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med. dent.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von Bert Müller, geboren am 28.06.1968 in Gera

angefertigt am Institut für Klinische Immunologie, Medizinische Fakultät der
Universität Leipzig, Johannisallee 30, 04103 Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. Ulrich Sack, PD Dr. Christian Gessner

Einreichungsdatum: 07.08.2020 Verteidigungsdatum: 4/14/2021

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 27.04.2021

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	3
1 EINFÜHRUNG	5
1.1 Epidemiologie der Tuberkulose.....	5
1.2 Pathogenese der Tuberkulose	8
1.3 Prävention der Tuberkulose	10
1.4 Diagnostik der Tuberkulose.....	11
1.4.1 Radiologische Untersuchungen	12
1.4.2 Mikrobiologische Untersuchungen	12
1.4.3 Molekularbiologischer Nachweis	13
1.5 Nachweis der Immunreaktion gegenüber <i>M. tuberculosis</i>	14
1.5.1 Tuberkulin-Hauttest	14
1.5.2 Serologische Tests auf <i>M. tuberculosis</i> -Infektion	16
1.5.3 Zelluläre Labortests auf <i>M. tuberculosis</i> -Reaktivität.....	18
2 AUFGABENSTELLUNG	22
3 MATERIAL UND METHODEN	23
3.1 Patienten	23
3.2 Blutentnahme und Zellpräparation	23
3.3 ELISPOT	25
3.4 Ringversuch zur externen Qualitätssicherung.....	26
3.5 Retrospektive Analyse der Daten des eigenen Labors und der Ringversuchsdaten	26
3.6 Analyse der Validierungsdaten aus Ettlingen	27
4 ERGEBNISSE	29
4.1 Analyse der ELISPOT-Daten des eigenen Labors	29
4.2 Ergebnisse des Instand-Ringversuchs.....	33
4.3 Analyse der ELISPOT-Wiederholungsmessungen.....	35
5 DISKUSSION.....	41
6 Zusammenfassung.....	48
Literaturverzeichnis	52

Lebenslauf.....	63
Danksagung.....	64
Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	65

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- ANOVA – Varianzanalyse
AP – alkalische Phosphatase
ATB – aktive Tuberkulose
BCG – Bacille Calmette-Guérin
CE – Conformité Européen
CFP – culture filtrate protein
CI – Konfidenzintervall
DNA – Desoxyribonukleinsäure
ELISA – enzyme linked immunosorbent assay
ELISPOT – Enzyme linked immunospot assay
ESAT – early secretory antigenic target
FN – falsch negativ
FP – falsch positive
HIV – human immunodeficiency virus
IFN – Interferon
IGRA – Interferon-gamma release assay
ISO – International Organization for Standardization
IVD – In-vitro-Diagnostikum
LTB – Latente Infektion mit *M. tuberculosis*
MDR – multi drug resistant
MPG – Medizinproduktegesetz
NTM – nicht tuberkulöse Mykobakterien
PBMC – peripheral blood mononuclear cells
PCR – Polymerasekettenreaktion
PHA – Phythämagglutinin
PPD – purified protein derivate
PPV – positive predictive value
RKI – Robert-Koch-Institut
RN – richtig negativ

RP – richtig positiv

SD – standard deviation

SFC – spot forming cells

STIKO – Ständige Impfkommission

TB – Tuberkulose

THT – Tuberkulin-Hauttest

TNF – Tumornekrosefaktor

XDR – extensively drug resistant

WHO – Weltgesundheitsorganisation

1 EINFÜHRUNG

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der Eignung zellulärer Testsysteme zum Nachweis einer erfolgten zellulären Immunisierung durch *M. tuberculosis*. Im Folgenden wird eine kurze Einführung zur Tuberkulose gegeben, die sich an zwei Übersichten aus dem Forschungszentrum Borstel und der Charité anlehnt (Krummel 2011; Ziemann 2014).

1.1 EPIDEMIOLOGIE DER TUBERKULOSE

Tuberkulose ist eine chronische Infektionskrankheit, die nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) die Statistik der tödlichen Infektionskrankheiten weltweit anführt. Sie wird durch Bakterien des Mykobakterium-Tuberkulose-Komplexes verursacht. Diese Bakterien aus der Familie der Mycobacteriaceae sind stäbchenförmig, aerob, nicht sporenbildend und säureresistent (1). Zum *M. tuberculosis*-Komplex gehören auch *M. tuberculosis var. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. canetti*, *M. microti* und *M. pinnipedii*. Tuberkulose kann sowohl beim Menschen als auch bei Tieren auftreten, z.B. bei Paarhufern (*M. bovis*), Nagetieren (*M. microti*) und Robben (*M. pinnipedii*) (Fitzgerald 2005, Oh et al. 2002).

Schon in der Antike litten die Menschen an Tuberkulose. Beweise dafür sind DNA-Spuren als Hinweis auf Tuberkulose-Infektionen auf 5000, 3200 und 2300 Jahre alten menschlichen Skeletten aus Ägypten, Indien und China (Zink et al. 2003, Daniel 2006). Robert Koch gelang 1882 (1843-1910) *M. tuberculosis* als Erreger der Tuberkulose (Koch 1882).

Mit der industriellen Revolution im 19. Jahrhundert verbreitete sich die Tuberkulose in den europäischen Großstädten in großem Maßstab. Wiederholte Pandemien wurden durch die Armut der Bevölkerung, Unterernährung und mangelnde Hygiene verursacht. London, Stockholm und

Hamburg meldeten 800-1000 Todesfälle pro 100 000 Einwohner (Manchester 1984, Krause 1982).

Tuberkulose ist weltweit immer noch stark verbreitet. Im Jahr 2017 starben 1,6 Millionen Menschen an dieser Infektionskrankheit, wie die WHO in ihrem Jahresbericht für 2018 berichtet (Weltgesundheitsorganisation 2018). In ihrer Veröffentlichung schätzt sie, dass im Jahr 2017 zehn Millionen Menschen an Tuberkulose erkranken werden. Offiziell verzeichnete die WHO nur 6,4 Millionen Fälle. Die Schätzung liegt jedoch deutlich höher, da die Fälle oft nicht gemeldet oder falsch diagnostiziert werden (Weltgesundheitsorganisation 2018).

In Deutschland gab es nach Angaben des Robert-Koch-Instituts im Jahr 2017 5542 gemeldete Tuberkulosefälle, in den Jahren zwischen 2008 und 2014 jeweils weniger als 5.000 Fälle, zwischen 2001 und 2003 jedoch mehr als 7.000 Fälle (siehe Abbildung 1) (Robert-Koch-Institut 2018).

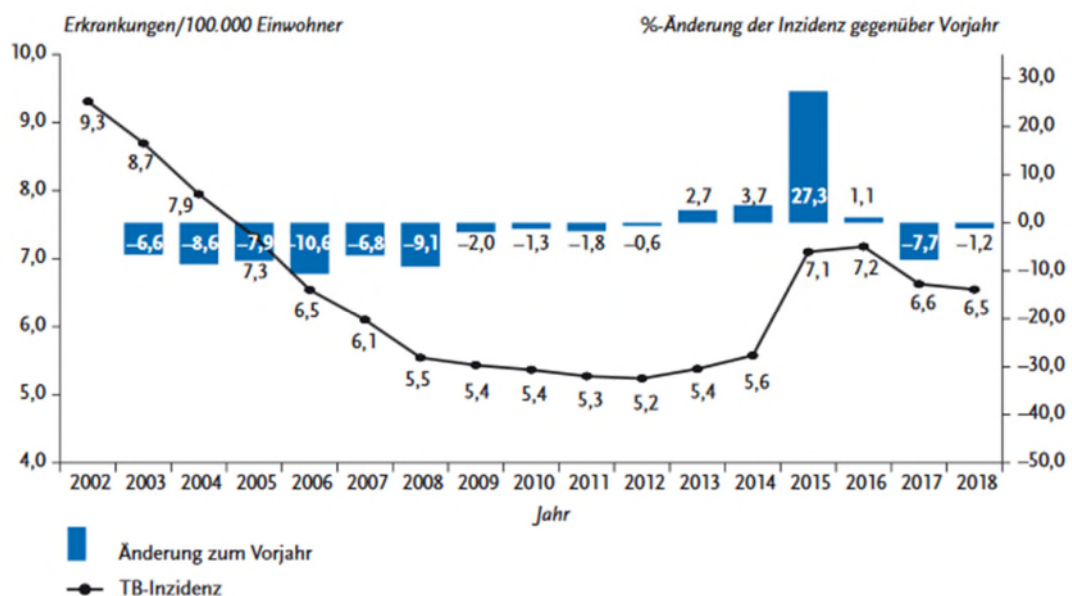


Abbildung 1: Inzidenz der Tuberkulose in Deutschland nach der Statistik des RKI von 2002 bis 2018 (Robert-Koch-Institut 2018).

In Sachsen wurden im Jahr 2017 155 Fälle von Lungentuberkulose gemeldet, was einer Inzidenz von 3,8 Fällen pro 100.000 Einwohner entspricht. Damit liegt Sachsen seit 1991 unter dem Bundesdurchschnitt von 5,4 (Schubert 2018).

HIV-Infizierte haben aufgrund ihres geschwächten Immunsystems ein bis zu 50 Mal höheres Risiko, an Tuberkulose zu erkranken. Eine Tuberkulose-Infektion kann wiederum den Ausbruch von AIDS beschleunigen.

Tuberkulose tritt vor allem in strukturschwachen und sehr armen Regionen Afrikas, Osteuropas und Zentralasiens auf, weshalb sie auch oft als "Krankheit der Armut" bezeichnet wird. Zwei Drittel der Neuinfektionen im Jahr 2017 wurden in Indien, Indonesien, China, Pakistan, Bangladesch, Nigeria, Südafrika und auf den Philippinen registriert (Weltgesundheitsorganisation 2018). Aus Europa sowie Nord- und Südamerika wurden sechs Prozent aller Fälle gemeldet. Dabei ist davon auszugehen, dass rund ein Viertel der Weltbevölkerung zwar mit entsprechenden Bakterien infiziert ist, jedoch nur ein kleiner Anteil der Infizierten letztendlich tatsächlich an einer Tuberkulose erkrankte (World Health Organisation 2018).

Es gibt jedoch auch Fortschritte in der Behandlung der Tuberkulose. So entgingen zwischen 2000 und 2017 schätzungsweise 54 Millionen Tuberkulosekranke dank entsprechender Behandlung laut WHO-Bericht von 2018 dem Tod, was einem Rückgang der Sterblichkeit von drei Prozent im Vergleich zum Vorjahreszeitraum entsprach (World Health Organisation 2018).

Besorgnis erregt die Zunahme multiresistenter Stämme bei der Tuberkulose (engl.: multidrug-resistant [MDR] tuberculosis; Resistenz gegenüber mindestens Isoniazid und Rifampizin). Hier ist die Entwicklung besonders dramatisch in Aserbaidshan, Moldawien und Tadschikistan, wo hohe Raten der Neuinfektionen als MDR-Tuberkulose klassifiziert wurden (World Health Organisation 2018), Beachtung gilt auch dem Auftreten von XDR (extensively

drug-resistant)-Tuberkulosefällen in KwaZulu-Natal, einer Provinz an der Ostküste Südafrikas mit mehr als zehn Millionen Einwohnern, wobei hier eine Kombination aus HIV-Infektion und Tuberkulose verzeichnet wurde (Gandhi et al. 2006). Bei der XDR-Tuberkulose besteht eine Resistenz gegenüber Isoniazid, Rifampizin sowie mindestens einem Fluorochinolon und mindestens einem der intravenös verabreichten Antibiotika Amikacin, Capreomycin oder Kanamycin (Raviglione et al. 2007).

Aus der eigenen Arbeitsgruppe wurden dazu besonders Untersuchungen zur Situation in Äthiopien durchgeführt (Biadlegne et al. 2013, 2013a, 2013b, 2014, 2014a, 2014b, 2014c, 2015, 2015a; Mekonnen et al. 2019; Tessema et al. 2012, 2012a, 2013).

1.2 PATHOGENESE DER TUBERKULOSE

Die Infektion mit *M. tuberculosis* erfolgt überwiegend inhalativ durch Husten, Niesen oder in seltenen Fällen durch Sprechen von einer mit Lungentuberkulose erkrankten Person auf eine gesunde Person. Die Bakterien gelangen im Aerosol zum Teil bis in die Alveolen. In der Lunge werden sie von neutrophilen Granulozyten, Alveolarmakrophagen und dendritischen Zellen phagozytiert, jedoch nicht immer abgetötet (Kaufmann et al. 2003).

Bei der Primärinfektion mit *M. tuberculosis* ist nahezu immer die Lunge betroffen. Häufig bleibt sie unbemerkt oder geht mit nur geringem Krankheitsgefühl einher. Bei intakten immunologischer Abwehr des Organismus gegen *M. tuberculosis* kommt es zur Ausbildung von „verkäsenden“ Granulomen im Lungenparenchym. Diese „Tuberkel“ und die ebenfalls reagierenden Hiluslymphknoten bilden den sog. Primärkomplex. Folgen sind Vernarbungen und teils Verkalkungen, das Auftreten radiologischer Veränderungen ist dabei deutlich mit dem Immunstatus des Patienten assoziiert (Geng et al. 2005).

Pulmonale Erkrankungen durch nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM) sind gegenüber der echten Tuberkulose selten - ihr Auftreten wird durch vorbestehende bronchopulmonale Erkrankungen und Beeinträchtigungen der Immunabwehr begünstigt. Eine als besonders virulent geltende NTM-Spezies ist *M. kansasii*, das etwa 10 % aller NTM-Isolate ausmacht. Patienten mit pulmonaler Erkrankung durch *M. kansasii* sind fast immer klinisch krank, sie zeigen meist die typischen Symptome und Befunde einer klassischen Tuberkulose. Die Inzidenz der pulmonalen *M. kansasii*-Infektion scheint in den letzten Jahren bei Nicht-HIV-Patienten anzusteigen (Psoma et al. 2011). Ähnliches gilt für *M. szulgai* und *M. marinum*, wobei letzteres vor allem Hautinfektionen verursacht (Aubry et al. 2017).

Eine latente *M. tuberculosis*-Infektion (LTB) ist die Situation, in der lebende Bakterien wahrscheinlich in Granulomen eingekapselt sind und daher jahrzehntelang fortbestehen können. In diesem Zusammenhang ist der Begriff "Infektion" ziemlich irreführend: LTB wird nicht durch den mikrobiologischen Nachweis von *M. tuberculosis* definiert, sondern durch eine positive immunologische Reaktion im Tuberkulin-Hauttest (TST) oder einen Interferon-gamma-Freisetzungstest (IGRA) bei Fehlen einer nachweisbaren aktiven Tuberkulose. Es ist jedoch nicht klar, welcher Anteil der Personen, die eine positive Immunreaktion auf THT oder IGRA haben, tatsächlich mit lebendem *M. tuberculosis* infiziert ist (Mack et al. 2009; zu IGRA siehe auch 1.5).

Nur ein Teil der Menschen mit LTB entwickelt im Laufe ihres Lebens eine aktive Tuberkulose. Dieser Anteil wurde in der Vergangenheit auf 5-10% geschätzt, obwohl neuere Studien darauf hindeuten, dass der Anteil wahrscheinlich höher ist (Tufariello et al. 2003, Diel et al. 2011). Das Risiko einer offenkundigen Erkrankung hängt von der Virulenz der Erreger und der individuellen Immunkompetenz ab. Sie ist in den ersten zwei Jahren nach der Primärinfektion am höchsten (Raviglione et al. 1995). Die aktive Tuberkulose entwickelt sich spät, als endogene Reaktivierung der LTB, oder bei immunkompetenten Personen seltener, in der primären Form. Es kann zu pulmonalen oder extrapulmonalen Manifestationen der Organe kommen

oder, im Falle einer blutübertragenen Ausbreitung und eines geschwächten Immunsystems, zu Miliartuberkulose. Bei immungeschwächten Kindern und Erwachsenen treten primäre und extrapulmonale Manifestationen häufiger auf. Die klinischen Symptome der manifesten Tuberkulose sind Husten, Inappetenz, Bluthusten und B-Symptome (Fieber, Gewichtsverlust, Nachtschweiß) (Robert-Koch-Institut 2018).

1.3 PRÄVENTION DER TUBERKULOSE

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde ein Schutzimpfstoff gegen Tuberkulose entwickelt (Small et al. 2001). Der Impfstoff besteht aus lebenden attenuierten Mykobakterien des *M. bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG)-Stammes. Bei Kindern kann die Impfung schwere Krankheiten wie Tuberkulose-Meningitis (Luelmo 1982) verhindern, bietet aber im Erwachsenenalter keinen Schutz. Aus diesem Grund wird der BCG-Impfstoff in vielen Ländern nicht mehr verwendet und ist von der Ständigen Kommission für Impfungen (STIKO) seit 1998 nicht mehr empfohlen. Die WHO hat auch vorgeschlagen, dass eine allgemeine Impfung mit BCG nicht mehr durchgeführt werden sollte, wenn das Infektionsrisiko in den betreffenden Gebieten weniger als 0,1% beträgt (Weltgesundheitsorganisation 2018).

Etwas anders stellt sich die Situation für die LTB in Bezug auf die Chemoprävention dar. Daher gibt es eine Zielempfehlung für LTB-Tests und Empfehlungen zur Chemoprävention:

- Menschen mit engem Kontakt zu einem kulturell oder molekular bestätigten Indexfall von Lungentuberkulose,
- Patienten vor der Einleitung oder unter Therapie mit TNF-alpha-Hemmern und
- Patienten mit einer HIV-Infektion.

Allerdings sind neben den bei rheumatoider Arthritis eingesetzten TNF-alpha-Hemmern auch andere Basistherapien wie Leflunomid, Cyclosporin A und Methotrexat mit einem deutlich erhöhten Tuberkulose-Risiko verbunden.

Im Gegensatz zu Erwachsenen sollte eine Chemoprävention bei Kindern mit nachgewiesener LTB immer durchgeführt werden. Der Grund für diese Empfehlung ist das erhöhte Progressionsrisiko, der generell kürzere Zeitraum bis zur Primärinfektion, das geringere Risiko von Nebenwirkungen und der langfristige Nutzen durch die frühzeitige Eliminierung des Erregers. Empfohlen wird die Kombination von Isoniazid und Rifampizin oral für 3 Monate oder eine Isoniazid-Monotherapie oral für 9 Monate (Feiterna-Sperling et al. 2017; Schaberg et al. 2017). Aktuelle Informationen und Leitlinien zur Diagnostik, Therapie einschließlich der Chemoprävention sowohl für die Tuberkulose als auch die LTB stehen für die Bundesrepublik Deutschland über die Homepage des DZK, des Deutschen Zentralkomitees zur Bekämpfung der Tuberkulose e.V., zur Verfügung (<https://www.dzk-tuberkulose.de/>).

1.4 DIAGNOSTIK DER TUBERKULOSE

Die Diagnostik der aktiven TB ist komplex. Zu ihr gehören mikrobiologische, molekularbiologische, zytologische, histologische, immunologische und radiologische Untersuchungen ebenso wie die klinische Bewertung der Einzelbefunde. Es hat sich gezeigt, dass dieses diagnostische Vorgehen nur im Zusammenspiel der verschiedenen diagnostischen Methoden mit ihren Vor- und Nachteilen sowie ihren unterschiedlichen Zeitfenstern bei der Umsetzung eines effizienten Nachweises sinnvoll ist (Kuhns et al. 2020). Dabei erfährt mit Hinblick auf Resistenzbestimmung und Virulenzfaktoren die Genomsequenzierung eine zunehmende Bedeutung (Kohl und Niemann 2020).

1.4.1 RADIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Das Röntgen des Thorax bzw. die Computertomographie stehen in der Diagnostik bei der aktiven Lungentuberkulose an erster Stelle. Die Spannbreite möglicher radiologischer Befunde bei der aktiven Tuberkulose ist groß. Sie reicht vom eher unauffälligen Röntgenbefunden über das pneumonisch anmutende Infiltrat (z.B. bei der Primärtuberkulose), dem soliden Rundherd bis hin zu kaum sichtbaren disseminierten kleinnodulären Veränderungen (z.B. bei der Miliartuberkulose). Typische infiltrative oder auch kavernöse Veränderungen in den Oberlappen, dem Mittellappen, der Lingula oder den apikalen Unterlappen finden sich bei der postprimären Tuberkulose.

Pleurakuppenschwielen, intrapulmonale Kalzifikationen, verkalkte Lymphknoten, narbig-fibrotische Lungen- und Pleuraveränderungen und eine fibrotische Kranialraffung der Hili können auf eine früher pulmonale Tuberkulose hinweisen.

Zu beachten ist, dass keine der oben genannten radiologischen Veränderungen eine ausreichende Spezifität besitzt und ein radiologischer Einzelbefund weder eine aktive Tuberkulose noch eine LTB beweisen bzw. andere Grunderkrankungen ausschließen kann.

1.4.2 MIKROBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Für die mikrobiologische Untersuchung werden respiratorische Sekrete (Sputum, Bronchialsplungen oder bronchoalveoläre Lavage), Magensaft oder Gewebeproben verwendet.

Der Nachweis von Mykobakterien erfolgt meist mittels Auramin-Rhodamin- und Ziehl-Neelsen-Färbung. Jedoch ist der Nachweis säurefester Stäbchen allein noch kein Beweis für das Vorliegen einer aktiven Tuberkulose, da sich nicht-tuberkulöse Mykobakterien (NTM) oder *Nocardia* spp. sich ebenfalls färberisch darstellen.

Der definitive Nachweis einer aktiven Tuberkulose basiert auf dem kulturellen Nachweis von Mykobakterien und gilt als Goldstandard der Tuberkulosedagnostik. Die Tuberkulose-Kultur wird aufgrund des langsamen Wachstums der Mykobakterien im Durchschnitt erst nach zwei bis vier Wochen positiv. Bei fehlendem Wachstum werden Tuberkulose-Kulturen erst nach sechs bis acht Wochen als negativ befundet.

1.4.3 MOLEKULARBIOLOGISCHER NACHWEIS

Der molekularbiologische Nachweis einer aktiven Tuberkulose kann mit Hilfe eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgen und liefert binnen Stunden ein Ergebnis. Die Sensitivität molekular-biologischer Methoden liegt jedoch unter der der Kultur.

Eine alleinige positive PCR weist nur genetisches Material der Mykobakterien nach und kann als alleiniger Befund keine Tuberkulose diagnostizieren.

In unserer Arbeitsgruppe wurden zu diesem Thema Arbeiten vor allem von B. Tessema durchgeführt, der die Situation in Äthiopien untersuchte (Tessema et al. 2012, 2012a, 2013).

1.5 NACHWEIS DER IMMUNREAKTION GEGENÜBER *M. TUBERCULOSIS*

Die Immunantwort gegenüber Mykobakterien basiert vor allem auf zellulären Mechanismen. Der Nachweis einer Immunreaktion gegenüber *M. tuberculosis* ist nicht mit dem Nachweis einer Infektion gleichzusetzen (Berrocal-Almanza et al. 2019; Gupta et al. 2019; Halliday et al. 2019; Lalvani et al. 2019). Drei Verfahren sind hier erwähnenswert: Der Tuberkulin-Hauttest, die Serologie, und Interferon-Gamma-Freisetzungstests.

1.5.1 TUBERKULIN-HAUTTEST

Vor über 100 Jahren, im Jahre 1907, wurde zur Immundiagnostik einer Infektion mit *M. tuberculosis* von Clemens von Pirquet ein Tuberkulin-Hauttest (THT) eingeführt (Pirquet 1907), der 1908 durch Felix Mendel und zwei Jahre später von Charles Mantoux weiter entwickelte wurde (Mendel 1908, Mantoux 1910).

Dieser THT beruht auf der Induktion und Messung einer Immunantwort vom verzögertem Typ (Typ IV nach Coombs und Gell) 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 (Huebner et al. 1993, Menzies 2000).

In August 2005 wurde in Deutschland das Tuberkulin RT 23 SSI des Kopenhagener Statens Serum Instituts 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 und wird in Millimetern dokumentiert (American Thoracic Society 2000).

Für ein positives Ergebnis werden je nach Bacille Calmette-Guérin (BCG)-Impfstatus, Immunstatus und klinischer Fragestellung Grenzwerte zwischen 5-15 mm verwendet. Die Sensitivität des THT bei der aktiven Tuberkulose liegt in der Regel bei ca. 68 % und die Spezifität bei ca. 75 % (Sester et al. 2011). Bei immunsupprimierten Patienten mit verminderter Typ IV-Immunantwort und aktiver Tuberkulose fällt die Sensitivität des THT teilweise bis auf unter 40 % (Liebeschuetz et al. 2004). Bei der LTB liegt die mutmaßliche Sensitivität des THT bei ca. 71 %, die Spezifität bei ca. 89 % und nach einer relevanten Tuberkulose-Exposition der positive Vorhersagewert (positive predictive value, PPV) zum Übergang von einer asymptomatischen LTB zu einer aktiven TB zwischen 2,1 bis 3,1 (Sester et al. 2011).

Da es sich beim Tuberkulin und auch beim seit 1932 verwendeten purified protein derivate (PPD) um eine Mischung unspezifischer mykobakterieller Proteinen handelt, ist die Spezifität des THT für die Diagnose einer Infektion mit *M. tuberculosis* begrenzt. Zum einen kann anhand eines positiven THT nicht zwischen einer aktiven Tuberkulose und einer asymptomatischen LTB unterschieden werden, zum anderen fällt der THT nach BCG-Impfung oder bei einer NTM-Infektion in der Regel positiv aus.

Die Reproduzierbarkeit des THT ist ebenfalls limitiert, da bei wiederholten Testungen ein Booster-Effekt mit falsch positiven Ergebnissen eintreten kann.

Ein weiterer Nachteil des THT ist die Notwendigkeit einer erneuten Patientenvorstellung zum Ablesen des Ergebnisses. Seit ca. 2016 steht der Tuberkulin-Hauttest nach Mendel-Mantoux nicht mehr zur Verfügung und wurde durch moderne immunologische Nachweismethoden, das sogenannte Interferon-gamma-release Assay (IGRA), abgelöst.

1.5.2 SEROLOGISCHE TESTS AUF *M. TUBERCULOSIS*-INFEKTION

Obwohl die Immunantwort gegenüber Mykobakterien vor allem zellulär ist, finden sich nach Infektion bei Patienten auch Antikörper. In den letzten zehn Jahren wurden serologische Tests für die Tuberkulose-Diagnose ausgiebig untersucht und mehrere vielversprechende Kandidatenantigene identifiziert und bewertet, wie z.B. 12 kDa, 38 kDa, LAM, 16 kDa (dies sind die Antigene, die derzeit für die Entwicklung von durchflusszytometrischen Tests verwendet werden), CFP-10, Rv3425 und Antigen 60 (Gennaro, 2000; Chan et al., 2000). Eine Reihe kommerzieller Antikörpernachweistests wurde ebenfalls entwickelt und in Regionen mit unterschiedlichen TB-Endemizitätsraten ausgewertet.

Nach systematischen Übersichten von Evaluierungsstudien variiert die diagnostische Genauigkeit der kommerziellen serologischen Tests stark in der Leistung, aber mit sehr uneinheitlichen Schätzungen der Sensitivität und Spezifität. Keiner der kommerziellen Tests hat gut genug gearbeitet, um die Sputumabstrichmikroskopie zu ersetzen (Steingart et al., 2007, Steingart et al., 2007a, Steingart et al., 2011). Im Jahr 2011 empfahl die Weltgesundheitsorganisation (WHO), diese Tests nicht für die Diagnose der pulmonalen und extrapulmonalen Tuberkulose zu verwenden (Weltgesundheitsorganisation, 2011). Trotzdem wurde die zukünftige Verwendung der serologischen Tests nicht ausgeschlossen (Ivanyi, 2012, Achkar und Ziegenbalg, 2012).

Die WHO hat lange Zeit die Forschung über die serologische Diagnose von Tuberkulose unterstützt, weil sie in hoch belasteten, ressourcenbeschränkten Regionen viele Vorteile in Form von Point-of-Care-Schnelltests bieten kann, die derzeit in der TB-Diagnostik-Pipeline fehlen (World Health Organization, 2011, Morris, 2011). Allerdings ist dieses Vorgehen nicht unumstritten (MacPherson et al. 2014).

Die serologischen Tests sind auch deshalb attraktiv, weil sie das diagnostische Potenzial haben können, zwischen aktiver Krankheit und latenter Infektion zu unterscheiden, was eine deutliche Verbesserung gegenüber den derzeitigen Routinetestmethoden darstellt. Die spezifischen Antikörperreaktionen werden bei nicht-symptomatischen Personen nur selten nachgewiesen (Daniel et al., 1991). Für das am häufigsten evaluierte A60-Antigen haben mehrere Studien gezeigt, dass der Prozentsatz der Positivität und die A60-IgG-Titer bei inaktiven postprimären TB-Patienten viel niedriger sind als bei aktiven TB (ATB)-Patienten (Luh et al., 1996, Gevaudan et al., 1992, Zou et al., 1994). In einer Studie wurden bei Patienten mit inaktiver TB im Vergleich zu Patienten mit ATB signifikant niedrigere Antikörperspiegel von 38 kDa und 16 kDa Antigenen festgestellt, allerdings wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit inaktiver Tb und Kontrollfällen gefunden (Senol et al., 2007). Eine Studie von Anderson et al. wies auch darauf hin, dass die positive Rate des serologischen Tests bei Personen mit einer von der IGRA identifizierten latenten Infektion geringer war und der serologische Test möglicherweise die Fähigkeit hat, die Unterscheidung zwischen ATB und LTb zu unterstützen (Anderson et al., 2008).

Diese Unterschiede in der Antikörperreaktion zwischen aktiver und latenter TB sind auffällig, Daher muss das diagnostische Potenzial serologischer Tests zur Unterscheidung zwischen aktiver und latenter TB-Infektion noch gründlich untersucht werden. Darüber hinaus wurde bisher auch nicht analysiert, ob eine Kombination aus serologischen Tests und T-Zell-basierten IGRAs die höchste diagnostische Wirksamkeit erreichen könnte.

1.5.3 ZELLULÄRE LABORTESTS AUF *M. TUBERCULOSIS*-REAKTIVITÄT

Mit der Entdeckung von *M. tuberculosis*-Antigenen, die in *M. bovis BCG* (Mahairas et al. 1996) und in den meisten NTM (Harboe et al. 1996) nicht vorkommen, konnten Ende der 1990er Jahre zum ersten Mal Tests entwickelt werden, die unabhängig von vorausgegangener BCG-Impfung und Kontakt zu NTM sind (Lein et al. 1999).

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 (Brodin et al. 2004). Für beide Proteine fehlen die entsprechenden Sequenzen im Genom des Impfstammes *M. bovis BCG* und bei den meisten NTM-Stämmen (Mahairas et al. 1996, Gey van Pittius et al. 2006), Ausnahmen bilden dabei *M. kansasii*, *M. marinum* und *M. szulgai* (Sorensen et al. 1995). Auch Kreuzreaktionen mit *M. leprae* sind beschrieben. Die genaue Funktion von ESAT-6 und CFP-10 in vivo ist nicht bekannt.

Ist ein Patient mit *M. tuberculosis* infiziert, kommt es über die Stimulation von *M. tuberculosis* freigesetzten Antigenen wie ESAT-6 und CFP-10 zu einer vermehrten Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) durch *M. tuberculosis*-spezifische T-Helferzellen (Lalvani et al. 2001a, Andersen et al. 2000). Diese Immunantwort ist die Grundlage der modernen IFN- γ release assays (IGRA).

Beide kommerziell verfügbaren Testprinzipien weisen Effektor-T-Zellen nach, die auf Stimulation mit einer Kombination von Peptiden reagieren, die ESAT-6- und CFP-10-Antigene enthalten. ESAT-6 und CFP-10 fehlen bei allen BCG-Stämmen und bei den meisten nicht-tuberkulösen Mykobakterien mit Ausnahme von *M. kansasii*, *M. szulgai* und *M. marinum* (Andersen et al. 2000; Behr et al. 1999; Lalvani 2003). Im Gegensatz dazu haben Personen,

die mit *M. tuberculosis*-Komplex-Organismen (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*) infiziert sind, in der Regel T-Zellen im Blut, die diese und andere mykobakterielle Antigene erkennen.

Einer der beiden Tests, der Enzyme-linked Immunospot Assay (ELISPOT) weist einzelne Antigen-spezifische T-Zellen nach (Parita et al. 2017, Jafari et al. 2008). Hersteller von CE-gelabelten IVD-Testkits sind derzeit Oxford Biotechnology (Oxford, UK), AID (Strassberg) und Lophius (Regensburg). Hierzu wird zunächst aus heparinisiertem, venösem Blut das Blutvolumen bestimmt, in dem sich eine definierte (i.d.R. 250.000 Zellen) Anzahl mononukleärer Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) befindet. Dieses Blutvolumen wird typischerweise zusammen mit den Antigenen ESAT-6 und/oder CFP-10 in die Näpfcchen einer Mikrotiterplatte pipettiert, die (beim IFN- γ -ELISPOT) mit anti-Interferon-gamma-Antikörpern beschichtet sind. Die Zellen werden mit den Antigenen über Nacht inkubiert. Bei einer Infektion mit *M. tuberculosis* und gleichzeitigem Kontakt mit ESAT-6 und CFP-10 *in vivo* im Vorfeld produzieren die spezifischen T-Helferzellen nach erneutem Kontakt *in vitro* vermehrt IFN- γ , das am Boden der Mikrotiterplatten an die anti-IFN- γ -Antikörper bindet. Durch Zugabe eines zweiten Antikörpers wird das gebundene IFN- γ am Boden der Platten in einer Farbreaktion sichtbar gemacht (Lalvani et al. 2001).

Jede IFN- γ -produzierende, also *M. tuberculosis*-spezifisch reagierende 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.

Eine alternative Methode sind sogenannte Röhrchen-Tests, angeboten unter anderem von SD Biosensor (Suwon, Südkorea), Wantai (Beijing, China), Lionex (Braunschweig), Biopanda (Belfast, Nordirland), Qiagen (Hilden) und Diasorin (Saluggia, Italien). Venöses Blut wird dabei in mehreren Entnahmeröhrchen mit *M. tuberculosis*-spezifischen Antigenen sowie einer nicht stimulierten Negativkontrolle ohne Antigen inkubiert. Anschließend wird statt der Anzahl der *M. tuberculosis*-spezifischen Zellen die Menge des

produzierten IFN- γ mittels Enzyme-linked Immuno-sorbent Assay (ELISA) durch Messung der Absorption im Photometer ermittelt (Mori et al. 2004).

Die beiden Testverfahren haben einige Gemeinsamkeiten. Es müssen beispielsweise die Blutproben wegen sonst verringerter Aktivität der T-Zellen in beiden Fällen innerhalb von 12 Stunden verarbeitet werden. Bei beiden Tests ist am Folgetag das Ergebnis verfügbar. Im Unterschied zum ELISA ist das ELISPOT-Verfahren wegen der notwendigen Zellseparation technisch anspruchsvoller, allerdings enthält die Probe auch eine definierte Anzahl von Zellen, was u.a. bei Patienten mit zellulären Immundefekten aufgrund der Standardisierung von Vorteil ist (Richeldi 2006, Leidl et al. 2010).

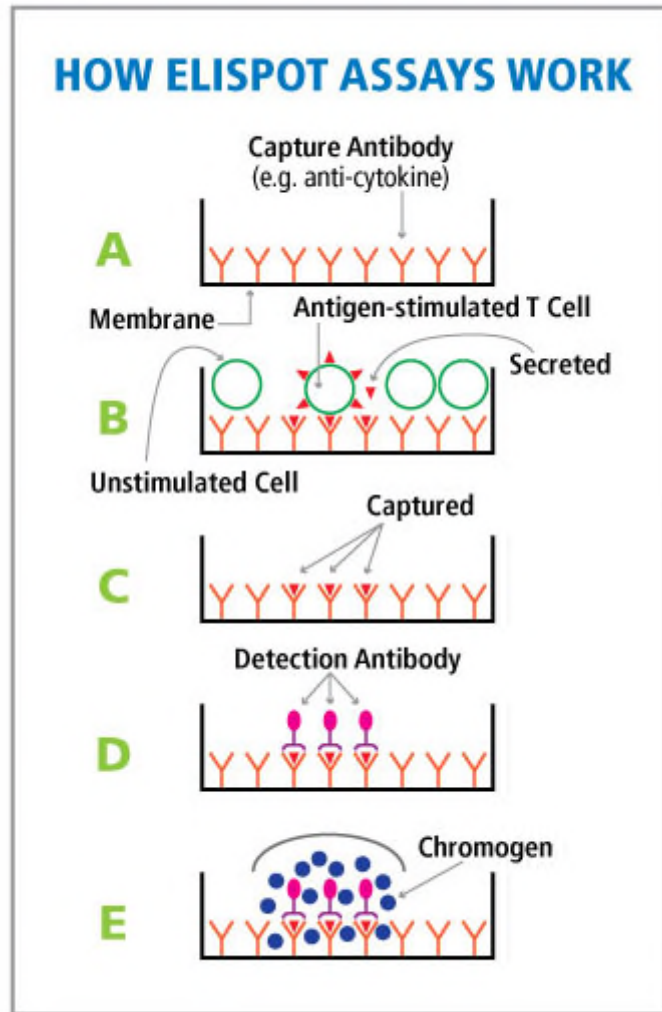


Abbildung 2: Typischer Ablauf eines ELISPOT-Assays zum Nachweis zytokinproduzierender Zellen bei Antigenstimulation (modifiziert nach <http://www.immunospot.eu/resources/protocols/ELISPOT-protocol.htm>)

2 AUFGABENSTELLUNG

Ziel vorliegender Arbeit war, die Nutzung von IGRA in der medizinischen Labordiagnostik kritisch zu analysieren. Im Einzelnen wurden dabei drei Ansätze verfolgt:

1. In einer retrospektiven Studie wurden die Ergebnisse von 2686 Patienten ausgewertet, die im Labor des Instituts für Klinische Immunologie der Universitätsklinikums Leipzig von 2013 bis 2016 untersucht wurden. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf Testergebnisse gelegt, die unerwartet positiv waren.
2. Analysiert wurden weiterhin die Ergebnisse der externen Qualitätssicherung von Instand e.V. (sogenannte Ringversuche) für IGRA hinsichtlich des erfolgreichen Abschneidens der teilnehmenden Laboratorien. Zudem wurde auf mögliche Unterschiede zwischen ELISPOT-Assay und Röhrchentests wie Quantiferon Gold- bzw. Quantiferon Plus-Test geprüft.
3. Darüber hinaus sollte der Auswertalgorithmus, der für die Analyse der ELISPOTS verwendet wird, unter Nutzung von Validierungsdaten aus einem diagnostischen Labor evaluiert und der vorgegebene Auswertalgorithmus des Herstellers überprüft werden.

Auf Basis der Ergebnisse sollten Aussagen dazu abgeleitet werden und zwar:

- ob es Unterschiede zwischen ELISPOT-basierten Tests und Verfahren mit Vorinkubation des Blutes in antigenhaltigen Blutentnahmeröhrchen (Röhrchen-Tests) gibt
- inwieweit diese Tests im klinischen Alltag verlässlich sind
- ob sich mit einem anderen Auswertalgorithmus eine sicherere Aussage zum Vorliegen einer latenten Tuberkulose treffen lässt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 PATIENTEN

Zwischen Oktober 2013 und Dezember 2016 wurde bei 2686 Proben im Rahmen der Routineuntersuchungen am Labor des Institutes für Klinische Immunologie der Universität Leipzig ein IGRA-Test mittels ELISPOT durchgeführt. Diese Tests erfolgten aus klinischer Indikation. Bei klinisch unplausiblen Ergebnissen wurden bei einem Teil der Patienten Wiederholungsuntersuchungen durchgeführt.

Zwischen 2011 und 2013 erfolgte im Labor Ettlingen eine umfangreiche Qualitätssicherung des ELISPOT unter Nutzung von 70 Proben. Die der Validierung zu Grunde liegenden Daten wurden uns anonymisiert zur Verfügung gestellt und konnten von uns analysiert werden.

In beiden Fällen handelt es sich um die retrospektive Analyse anonymisierter Daten aus der Routinediagnostik. Auf Grundlage des gegenwärtig gültigen Medizinproduktegesetzes (MPG) ergibt sich aus §24, dass die Verwendung von Probenresten und Anonymisierung kein Ethikvotum erforderlich ist (Meyer-Lüerßen und Thomas 2002).

3.2 BLUTENTNAHME UND ZELLPRÄPARATION

Bei allen Patienten wurden mittels venöser Blutentnahme 4.5 ml Blut in einem Lithium-Heparinröhrchen (Sarstedt, Nürtingen, Germany) entnommen. Daraufhin erfolgte die Isolation der mononukleären Zellen (peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)) aus der Blutprobe. Für die Isolation der Lymphozyten aus Vollblut wurde eine Dichtezentrifugation angewendet. Dazu wurde in einem Einwegröhrchen Ficoll vorsichtig mit verdünntem heparinisierendem Vollblut überschichtet und anschließend zentrifugiert. Ficoll besitzt mit 1,077 g/ml eine höhere Dichte als Lymphozyten, Monozyten und

Thrombozyten, aber eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten. Nach der Zentrifugation stellen sich somit verschiedene Phasen entsprechend ihrer Dichte getrennt dar. Am Boden des Einwegröhrchens befindet sich ein Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten, darauf folgen die Ficollschicht und anschließend eine Interphase aus Monozyten und Lymphozyten, welche einen weißen Ring bildet. Darüber ist nun noch eine Phase aus Plasma und Thrombozyten befindlich, siehe Abbildung 3.

Der Lymphozytenring wurde vorsichtig mit Hilfe einer Serumpipette abgesaugt und nach mehrmaligem Waschen zum Entfernen von Ficollresten weiterverwendet.

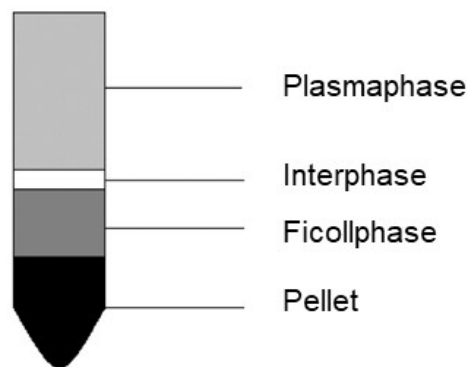


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Dichtezentrifugation mittels Ficoll. Gezeigt werden die verschiedenen Phasen, die sich nach Zentrifugation des mit Vollblut überschichteten Ficolls ergeben.

Zum Teil wurden die Zellen vor Verwendung im ELISPOT eingefroren. Um die volle Funktionalität von T-Zellen bei der Kryokonservierung der mononukleären Zellen zu gewährleisten, wurden Einfrieren und Auftauen nach den von Kreher et al. beschriebenen und in unserem Haus evaluierten Protokoll durchgeführt (Kreher et al. 2003). Es wurde vorher validiert, dass eingefrorene Proben identische diagnostische Aussagen zulassen wie frisch verarbeitete.

3.3 ELISPOT

Entsprechend der Herstellerempfehlungen wurde ein ELISPOT durchgeführt (Oxford Immunotech, GB). Hierbei wurden die Lymphozyten aus dem heparinisierten Vollblut isoliert und zu einer finalen Lösung von 250 000 Zellen/ml verdünnt. Anschließend wurden 100 μ l Lymphozytensuspension entweder mit ESAT-6 Antigen oder CFP-10 Antigen inkubiert. Unstimulierte Lymphozyten wurden als Negativkontrolle verwendet, wogegen Phythämagglutinin (PHA)-stimulierte Lymphozyten als positive Kontrollen dienten. Alle Zellen wurden in anti-IFN- γ vorbeschichteten 96er Mikrotiterplatten in RPMI-Medium inkubiert. Nach 24 Stunden bei 37° Celsius und 5 % CO₂ wurden ungebundene Zellen und Zytokine durch Waschen entfernt. Die Platten mit dem gebundenen IFN- γ wurden mit einem alkalische-Phosphatase (AP)-konjugierten Antikörper für 1 Stunde inkubiert. Nach dem Waschen wurden die IFN- γ -Spots mit einer Fällungsreagenz sichtbar gemacht. Die blau gefärbten Punkte wurden mit dem ELISPOT iSpotReader 5.05 Programm (AID, Strassberg, Germany) analysiert. Ein typischer Fall ist in Abbildung 4 gezeigt.

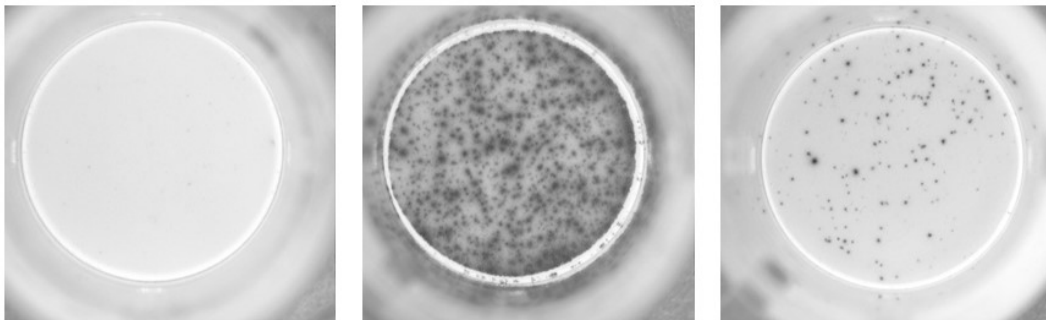


Abbildung 4: Typisches Bild der Negativkontrolle (links), Positivkontrolle mit PHA (Mitte) und positiver Reaktion auf ESAT-6/CFP-10. Die reaktiven Zellen sind als Spots zu sehen.

3.4 RINGVERSUCH ZUR EXTERNEN QUALITÄTSSICHERUNG

Seit 2012 sendet Instand e.V. zweimal jährlich Ringversuchsproben für den IGRA aus (Ringversuch 650, <https://www.instand-ev.de/>). Die Proben werden durch in.vent (<https://invent.bio/>) bereitgestellt und über Nacht an die teilnehmenden Labore verschickt. Die Ergebnisse werden nach Analysenmethoden getrennt ausgewertet. Instand e.V. ist nach ISO 17043 als Ringversuchsanbieter akkreditiert. Uns standen die anonymisierten Auswerteunterlagen zur Verfügung.

3.5 RETROSPEKTIVE ANALYSE DER DATEN DES EIGENEN LABORS UND DER RINGVERSUCHSDATEN

Die Daten unseres Labors wurden mit Microsoft Excel gesammelt. Für die eigenen Werte wurden Sensitivität, Spezifität, positiver prädiktiver Wert und negativer prädiktiver Wert geschätzt (Trevethan 2017), indem identische Ergebnisse bei Wiederholungsprüfung als Bestätigung der Korrektheit postuliert wurden. So wurden falsch (F) bzw. richtig (R) positive (P) und negative (N) Messwerte ermittelt.

$$\text{Sensitivität} = [\text{RP}/(\text{RP}+\text{FN})] \times 100$$

$$\text{Spezifität} = [\text{RN}/(\text{FP}+\text{RN})] \times 100$$

$$\text{Positiver prädiktiver Wert} = [\text{RP}/(\text{RP}+\text{FP})] \times 100$$

$$\text{Negativer prädiktiver Wert} = [\text{RN}/(\text{FN}+\text{RN})] \times 100$$

(Trevethan 2017)

Die Daten zum erfolgreichen Abschneiden von teilnehmenden Labore und den Ringversuchen von Instand wurden anonymisiert in Microsoft Excel gesammelt und mit SigmaPlot 14 (Systat, Erkrath, Germany) ausgewertet und graphisch dargestellt.

3.6 ANALYSE DER VALIDIERUNGSDATEN AUS ETTLINGEN

Anhand der ELISPOT Daten aus wiederholten Messungen im Labor in Ettlingen sollte überprüft werden, ob der vom Hersteller (Oxford Immunotec, UK) vorgegebene Wert, dass ein positiver Wert mindestens das Doppelte der Negativkontrolle betragen und mindestens 8 Spots mehr als diese haben sollte, korrekt ist. Zudem wurde in unserem Labor wegen zahlreicher falsch positiver Befunde dazu übergegangen, Befunde nur dann als positiv zu berichten, wenn in den Ansätzen mit den spezifischen Antigenen ESAT-6 und CFP-10 mindestens 10 Spots mehr nachweisbar sind als in der Negativkontrolle, um von einem positiven Ergebnis zu sprechen.

Für die Berechnung standen uns 71 Replikate zur Verfügung, 17 davon ESAT-6-positiv und 21 CFP-10-positiv. Bei der Berechnung wurden folgende Aspekte berücksichtigt bzw. angenommen:

Wegen der rechts-schiefen Verteilung der Daten und der Heterogenität der Varianzen der Replikate wurden die Daten wurzeltransformiert. Dies ist die empfohlene Transformation für Zählraten mit Poisson-Verteilung, wie sie bei ELISPOT-Messungen vorliegen (Altman 1991; Bland 2000).

Um relevante Unterschiede zwischen Negativkontrolle und der eigentlichen Messung zu bewerten, wurden die Unterschiede mit der Wiederholpräzision in Beziehung gesetzt: Die Unterschiede sollten größer sein als die sich dabei zeigende Ungenauigkeit (Impräzision) der Messung. Hierzu wurde die mittlere (gepoolte) Standardabweichung SD_{res} der probenweisen, replikatbezogenen Standardabweichungen berechnet. Technisch wird SD_{res} als residuale Varianzkomponente mit Hilfe Varianzanalyse (ANOVA) mit zufälligen Effekten (random effects model II ANOVA) mit dem Faktor „Probe“ geschätzt, wobei wurzeltransformierten Daten verwendet wurden (Altman 1991; Bland 2000).

Die intraserielle Präzision wurde innerhalb der Probandenvarianz geschätzt, indem eine Modell-II-ANOVA von Messwerten mit Patienten als

Zufallsfaktoren für jeden Analyten durchgeführt wurde (Altman 1991; Bland 2000). Der Durchschnitt dieser Schätzungen wird in den späteren Schritten verwendet. Die Varianzkomponenten wurden mit der Software Analyse-It (Analyse-it Software, Leeds, UK), Option Präzision, 1-Faktor-Analyse, geschätzt.

Die Wiederholpräzision SD_{res} wurde verwendet, um die kritische Differenz zu bewerten: Wann kann ein Messergebnis x aus statistischer Sicht als verschieden von der Negativkontrolle x_{neg} , d. h. als positiv, betrachtet werden? Hierbei ist die Zahl der Replikate n_{Rep} zu beachten ($n_{Rep}=2$). SD_{res} und n_{rep} wurden verwendet, um die kritische Differenz der Testresultate im Vergleich zu den Negativkontrollen mit Hilfe eines statistischen Tests zu bewerten. Hierzu wurde der z-Test verwendet (Test auf Unterschied von zwei Mittelwerten bei bekannter Standardabweichung, diese ist SD_{res}). Die experimentelle Hypothese ist $x > x_{neg}$, die Nullhypothese entsprechend $x \leq x_{ne}$. Die kritische Differenz ergibt sich als

$$\Delta_{crit} > z_{1-\alpha} \cdot SD_{res} \cdot \sqrt{2/n_{rep}}, \quad (\text{Gleichung 1})$$

wobei $z_{1-\alpha}$ die Quantile der Normalverteilung mit dem Level alpha ist (alpha=0,05: $z=1,645$). Für diese Analyse wurde ein Excel-Tool [https://www.acomed-statistik.de/math_files/ELISPOT_criterion.zip] verwendet.

Daraus wurde ein Cut-off-Wert kalkuliert, der unmittelbar auf den Daten des Labors beruht.

4 ERGEBNISSE

4.1 ANALYSE DER ELISPOT-DATEN DES EIGENEN LABORS

Basierend auf den 2682 angeforderten und ausgewerteten IGRA Untersuchungen waren 85,4 % der Patienten im ersten Test negativ, währenddessen 10,1 % sich als positiv darstellten. Bei 4,4 % der Patienten war der Test nicht auswertbar, was auf verschiedenste Gründe wie z.B. altes oder falsches Material zurückzuführen war. Die Differenz von 0,1 % ergibt sich aus dem Rundungsfehler. Auch innerhalb der Gruppen mit den positiven und negative Resultaten waren einige Ergebnisse nicht verwertbar, da sie initial schon eine erhöhte Basisstimulation (z.B. infolge einer akuten Infektion) aufwiesen oder Non-Responder waren, was z.B. als Folge eines primären oder sekundären Immundefektes, eines speziellen medikamentösen Therapie oder aus einem anderen nicht bekanntem Ursache auch auftreten kann.

Im klinischen Verlauf wurden entsprechend der Herstellerempfehlungen zur IGRA-Diagnostik 6,5 % der negativen und 16 % der positiven Fälle zu einem zweiten Zeitpunkt gemessen. Dabei konnten nur Proben von Patienten untersucht werden, die uns nochmals eingeschendet wurden. Das Zeitfenster zwischen erster und zweiter Messung schwankte dabei sehr stark mit Abständen von einigen Tagen bis hin zu mehreren Monaten.

In der Gruppe mit den negativ getesteten Patienten wurden 89,9 % erneut als negativ bestätigt. Bei nur 3 % der vorher negativen Fälle (4 Patienten) wurde in der Wiederholung ein positives Ergebnis festgestellt.

In der Gruppe der bei der ersten Messung positiv getesteten Patienten ließen sich nur bei 31,8 % der Fälle (14 von 44) die initial positiven Ergebnisse bestätigen. Bei 68,2 % fiel die zweite Untersuchung negativ aus.

Die Verteilung der Patienten ist in den Abbildungen 5a und b dargestellt.

IGRA-Anforderungen Oktober 2013 bis Dezember 2016: n=2686

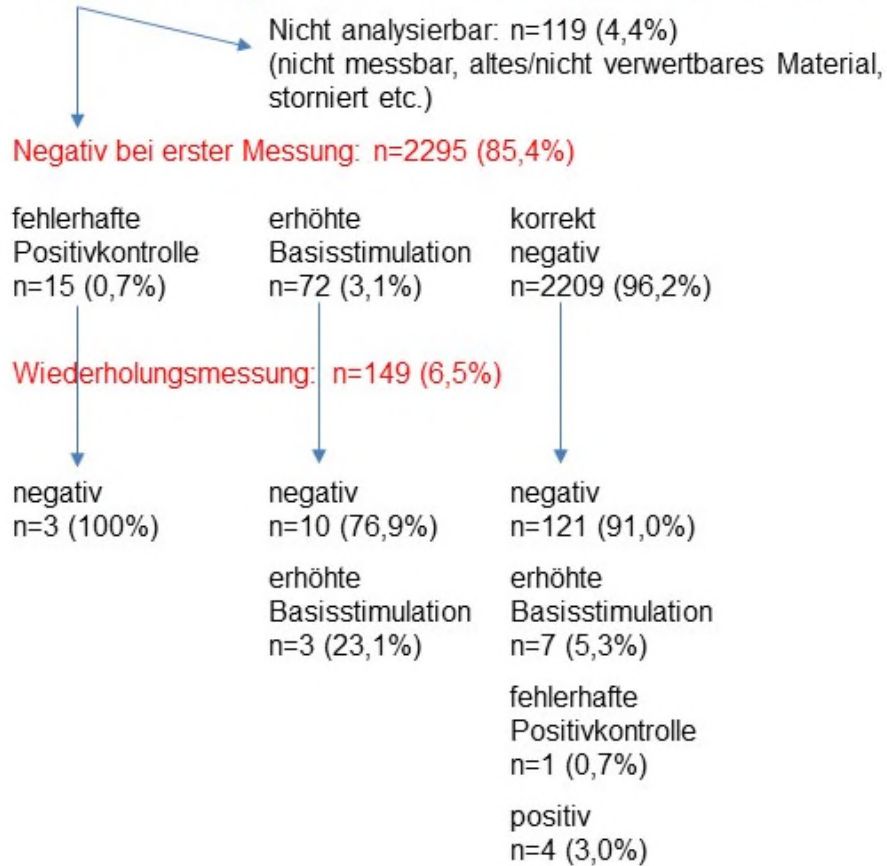


Abbildung 5a: Ablauf der Untersuchungen im Labor. Von 2686 IGRA-Anforderungen waren 2295 negativ. Von diesen wurden 149 wiederholt gemessen. Dabei ergab sich bei 3 % der Proben ein möglicherweise doch positives Ergebnis. Die anderen Ergebnisse waren wieder negativ und/oder mussten wegen unplausibler Kontrollen als negativ gewertet werden.

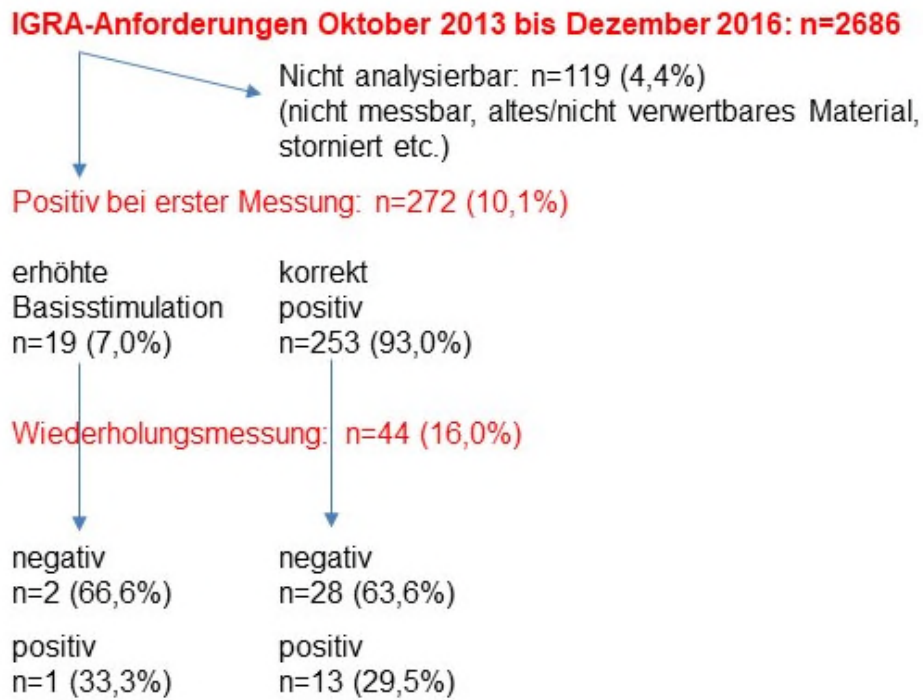


Abbildung 5b: Von 2686 Anforderungen fanden sich in der ersten Messung bei 272 Patienten positive Ergebnisse. Diese ließen sich in einer Stichprobe nur bei 14 von 44 Proben (31,8 %) bestätigen.

Für die Bewertung eines Tests sind neben der diagnostischen Spezifität und Sensitivität, zu der wir mangels klinischer Daten keine Aussagen machen können, die analytische Sensitivität und Spezifität sowie der positive und negative prädiktive Wert relevant. Wir können aus den vorliegenden Daten nur eine grobe Hochrechnung vornehmen, wenn wir davon ausgehen, dass der Ausfall in der Wiederholungsuntersuchung einen Hinweis auf falsch- oder richtig-positive oder -negative Werte zulässt. Zudem wurde angenommen, dass die Auswahl der Wiederholmessungen repräsentativ war. Die Werte sind in Abbildung 6 zusammengefasst.

		Immunisierung durch <i>M. tuberculosis</i>	Ohne Kontakt zu <i>M. tuberculosis</i>
Ergebnisse des ELISPOT	Positiv	87 richtig positiv	185 falsch positiv
	Negativ	231 falsch negativ	2064 richtig negativ

Abbildung 6: Diagramm zur Darstellung der falschen/richtigen positiven und negative Ergebnisse.

Die Sensitivität ist der Quotient aus richtig positiven Werten durch die Summe der richtig positiven und falsch negativen Ergebnisse. Kalkulieren wir das aus unseren Ergebnissen, kommen wir zu einer Sensitivität von nur 28 %.

Die Spezifität ergibt sich aus den richtig negativen geteilt durch Summe aus richtig negativen und falsch positiven, das wären immerhin 91 %.

Der Positive prädiktive Wert ist damit bei lediglich 32 %, der negative prädiktive Wert 90 %.

4.2 ERGEBNISSE DES INSTAND-RINGVERSUCHS

Von 2012 bis 2019 nahm die Zahl der Teilnehmer an den Ringversuchen stetig zu. Der Röhren-Test war hierfür hauptsächlich verantwortlich (Abbildung 7).

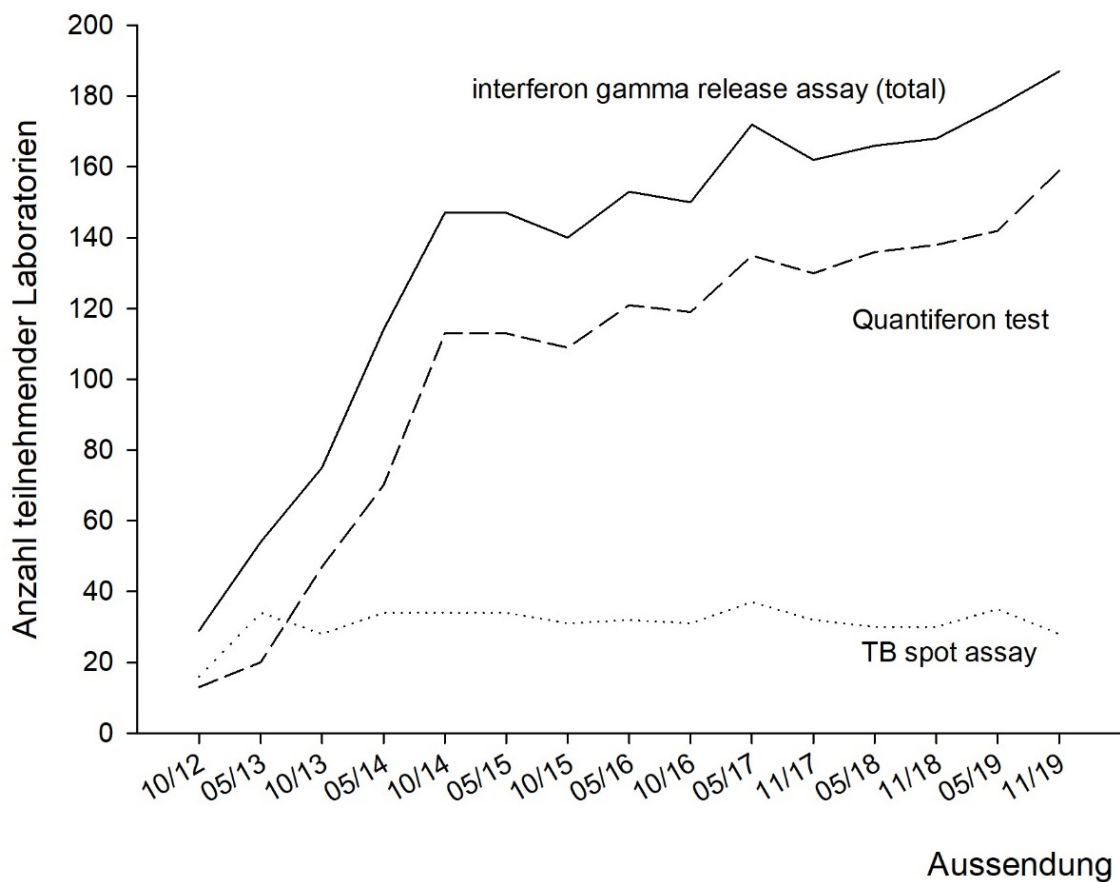


Abbildung 7: Anzahl der Labore, die am Instand-Ringversuch 650 zur externen Qualitätssicherung des IGRA teilgenommen haben (www.instandev.de). 11/2019 führten von 187 teilnehmenden Laboren 28 den ELISPOT und 159 den Röhren-Test durch.

Die Ergebnisse der teilnehmenden Labore mit beiden Tests, die bei der Analyse verwendet wurden: ELISPOT (z.B. TB-Spot, Oxford Immunotec) und Röhrchentest (z.B. Quantiferon Gold bzw. Gold-Plus, Qiagen oder Diasorin), sind bis auf den 2. Ringversuch 2019 vergleichbar und variieren nicht signifikant (Abbildung 8).

Einen besonderen Fall sahen wir im November 2019: Hier fand sich bei einer Probe im ELISPOT ein positives Ergebnis, während die Nutzer des Röhrchen-Tests kein oder ein negatives Ergebnis erhielten.

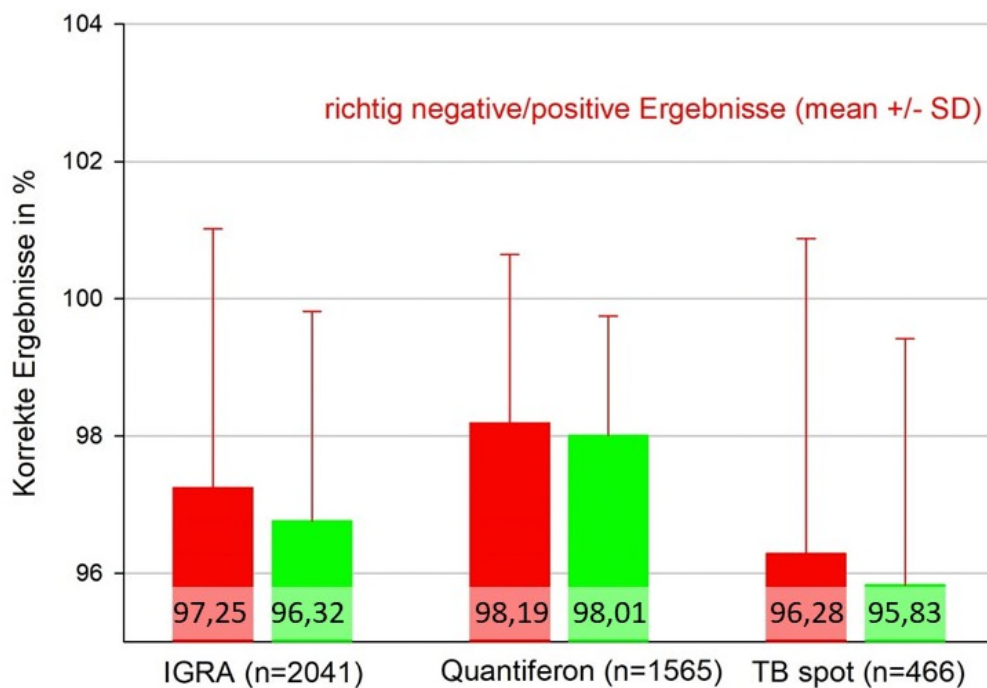


Abbildung 8: Anzahl der Labore, die von 2012 bis 2019 richtige Ergebnisse im Instand-Ringversuch 650 berichten. In den Säulen ist der Prozentsatz korrekter Ergebnisse angegeben. Es zeigen sich keine signifikanten Differenzen zwischen den Laboren, die den ELISPOT oder den Röhrchen-Test verwenden. Rot – negative Proben versandt; Grün – positive Proben versandt

4.3 ANALYSE DER ELISPOT-WIEDERHOLUNGSMESSUNGEN

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Überprüfung, ob nicht ein anderes Verfahren zur Auswertung des ELISPOT verwendet werden soll. Dazu konnten wir auf einen Datensatz mit Doppelbestimmungen zurückgreifen, der uns vom Klinikum in Ettlingen zur Verfügung gestellt wurde.

Wie in Kapitel 3.6 dargestellt, hängt bei quadratwurzeltransformierten Daten die Standardabweichung nicht von den mittleren Zellzahlen ab. Daher kann eine konstante Standardabweichung geschätzt und innerhalb des z-Tests verwendet werden.

Abbildungen 9 und 10 stellen Präzisionsprofile dar. Es wird die Streuung (=Standardabweichung der Duplikate), berechnet aus den original skalierten Daten (Abbildung 9) bzw. den wurzeltransformierten Daten (Abbildung 10), in Abhängigkeit von dem Mittelwert der Messergebnisse der entsprechenden Probe graphisch dargestellt. Ziel ist eine Bewertung hinsichtlich der Varianzenhomogenität, hier ist die vertikale Streuung der Werte unabhängig von der Anzahl (x-Achse). Liegt Varianzenhomogenität vor, können parametrische Verfahren zur Auswertung über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg herangezogen werden. Es wird bestätigt, dass die Wurzeltransformation (Abbildung 10) eine geeignete Verteilung ist, um ELISPOT-Daten mit gängigen statistischen Methoden auszuwerten.

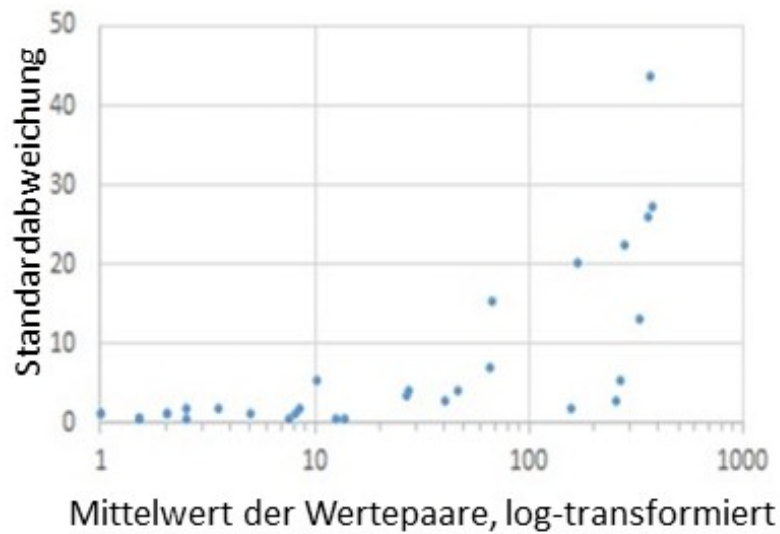


Abbildung 9: Dotplot der Standardabweichung der Duplikate, berechnet anhand der originalskalierten Werte vs. dem Mittelwert der Wertepaare. Der besseren Übersicht halber ist die x-Achse log-transformiert und zeigt die Werte.

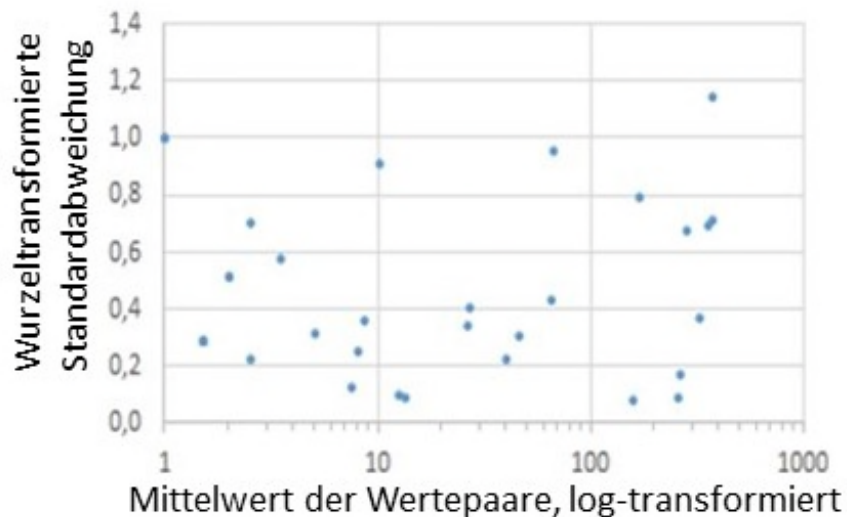


Abbildung 10: Dotplot der Standardabweichung der Duplikate berechnet, anhand der wurzeltransformierten Werte vs. dem Mittelwert der Wertepaare. Der besseren Übersicht halber ist die x-Achse log-transformiert und zeigt die Werte.

Paare mit einer Standardabweichung $>1,5$ galten als Ausreißer und wurden in den nächsten Analysen nicht verwendet. 6 Paare für die Positivkontrollen und ein Paar für ESAT-6 wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Die intraserielle Präzision wird innerhalb der Probandenvarianz geschätzt, indem eine Modell-II-ANOVA von Messwerten mit Patienten als Zufallsfaktoren für jeden Analyten durchgeführt wird (Altman 1991; Bland 2000). Der Durchschnitt dieser Schätzungen (gepoolte Standardabweichungen: Wurzel aus dem Mittelwert der Varianzen) wird in den späteren Schritten verwendet. Die gefundenen Standardabweichungen sowie der Durchschnitt sind in Tabelle 1 dargestellt. Es wird deutlich, dass die intraserialen SDs nicht von quadratwurzeltransformierten Werten der Variablen abhängen. Der gepoolte Wert von 0,463 wird bei den weiteren Auswertungen berücksichtigt.

Tabelle 1: Wiederholbarkeit (mit 95 %-CI) je Marker.

Variable	SD	95 %-CI
Negativkontrolle	0,444	0,382-0,532
Positivkontrolle	0,498	0,425-0,601
ESAT-6-Stimulation	0,424	0,361-0,515
CFP-10-Stimulation	0,482	0,411-0,584
Gepoolt	0,463	

SD: Intraserielle Standardabweichung; CI: Konfidenzintervall

Das bedeutet für diesen Test, dass seine Abweichung um den Faktor 0,463 der normalen Schwankung entspricht, letztendlich also die Wiederholbarkeit widerspiegelt.

Die kritische Differenz ist abhängig von der Anzahl der Wiederholungen. Das wird in Tabelle 2 dargelegt.

Tabelle 2: Kriterien für Unterschiede (für die Mittelwerte der Quadratwurzeltransformierten Daten) in Abhängigkeit von der Anzahl der Wiederholungen und der Intra-Batch-Standardabweichung.

SD	Kritische Differenz berechnet nach Gleichung 1		
	Repliziert		
	2	3	4
0.45	0.7380	0.6026	0.5218
0.46	0.7544	0.6160	0.5334
0.463	0.7616	0.6219	0.5386
0.47	0.7708	0.6294	0.5450
0.48	0.7872	0.6427	0.5566
0.49	0.8036	0.6561	0.5682
0.5	0.8200	0.6695	0.5798
0.55	0.9020	0.7365	0.6378
0.6	0.9840	0.8034	0.6958
0.65	1.0660	0.8704	0.7538

Unterlegte Zellen: notwendige aktuelle Daten für 2 Replikate und einer intraserialen SD von 0,463.

Wenn die Differenz der Mittelwerte der einzelnen Paare von quadratwurzeltransformierten Zählwerten (Marker vs. Kontrolle) größer als 0,7616 ist, wird ein positives Testergebnis erzielt.

Man kann also das Vorgehen wie folgt zusammenfassen: Die Wiederholbarkeit der wurzeltransformierten Werte wurde für jeden Marker, wie in Tabelle 1 abgebildet, ermittelt. Es ist erkennbar, dass sie nicht vom spezifischen Marker abhängt. Es ergibt sich (als Wurzel des Mittelwertes der quadrierten Standardabweichungen) eine gepoolte, also mittlere Wiederholbarkeit SD_{res} von 0,436, mit $n_{Rep}=2$ folgt ein $\Delta_{crit} = 0.7616$ ($\alpha=0.05$, $Z_{1-\alpha} = 1.645$). Ein Messwert wird als positiv betrachtet, wenn der Mittelwert der wurzeltransformierten Duplikate größer ist als die kritische Differenz ($> \Delta_{crit}$).

Die Anwendung dieses Kriteriums zu Unterschieden von Testergebnissen und Negativkontrollen (Quadratwurzeltransformierte Daten) führen zu positiven Raten von 100 % (Positivkontrolle), 27 % (ESAT-6) und 33 % (CFP-10) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Absolute and relative Frequenz der Messungen in Ettlingen mit einer Differenz (test – negative Kontrolle) $\geq / < \Delta_{cri}$.

Ansatz	Positivkontrolle		ESAT-6-Stimulation		CFP-10-Stimulation	
	N	%	N	%	N	%
Pos	65	100 %	17	27 %	21	33 %
Neg	0	0 %	45	73 %	42	67 %
Total (pos+neg)	65	100 %	62	100 %	63	100 %
<i>Fehlende</i>	5		8		7	
Total	70		70		70	

Dies entspricht exakt den in Ettlingen untersuchten Proben.

Wenden wir dieses Verfahren auf unsere eigenen Werte an, bedeutet dies, dass bei Doppelbestimmungen die Unterschiede zwischen dem Testergebnis immer um den Faktor 0,76 größer sein müssen als die Negativkontrolle. Dazu sind allerdings zwei Voraussetzungen zu erfüllen:

1. die Werte sind vor Analyse zu wurzeltransformieren
2. benötigt werden mindestens Doppelbestimmungen.

Da keine Doppelbestimmungen vorliegen, konnte das Verfahren nicht an einem eigenen Datensatz verifiziert werden.

5 DISKUSSION

Die Bestimmung der **zellulären Reaktivität** auf *M. tuberculosis*-Antigen stellt eine Standardmethode medizinischer Labore dar, mit deren Hilfe Aussagen bezüglich einer zurückliegenden Auseinandersetzung des Immunsystems mit o.g. Erreger bezüglich einer latenten Infektion, weniger aber über eine aktuelle Erkrankung getroffen werden können. Eine Differenzierung hinsichtlich der genauen zu Grunde liegenden Reaktionsmechanismen bzw. des Ausmaßes der Erkrankung ist mit Hilfe dieser Assays nicht möglich (Streitz et al. 2011). Es gibt einige Hinweise für eine gesteigerte Reaktivität mit TB-7.7 Peptiden im frühen Krankheitsstadium, aber diese Daten werden immer noch diskutiert (Barcellini et al. 2016). Eine latente Tuberkulose ist ein hohes Risiko für immunsupprimierte Patienten bzw. für Patienten mit laufender immunsuppressiver Therapie, wie in vielen Fällen gezeigt werden konnte (Min et al. 2012).

Eine wesentliche Anwendung des IGRA besteht in zahlreichen Ländern darin, bei der Einreise an der Grenze potenziell tuberkulöse Personen zu identifizieren, denen dann die Einwanderung untersagt oder die sich dann einer Therapie unterziehen müssen (Berrocal-Almanza et al. 2019; Lalvani et al. 2019).

Im Vergleich der beiden IGRAs ist nach aktueller Literatur die Sensitivität beim ELISPOT höher (82,3 %) als beim Röhrchen-Test (67,3 %). Die Spezifität ist nicht unterschiedlich (82,6 % bzw. 80,4 %; Takwoingi et al. 2019). Unsere Daten lassen dazu keine Aussagen zu, allerdings gibt der singuläre Fall zu denken, bei dem die Ringversuchsergebnisse in ELISPOT und Röhrchen-Test gegensätzlich ausfielen; dieser Befund stimmt mit dieser Referenz nicht überein. Eine Veränderung des Cut-off führte in anderen Studien nicht zu einer Verbesserung, da der PPV für eine Tuberkulose zwar besser wurde, dafür aber die Sensitivität sank (Gupta et al. 2019).

Neben den beiden Haupt-Tests, die die IFN- γ -Sekretion einer definierten, aus venösem Blut separierten Lymphozytenzahl (ELISPOT, T-Spot TB, Oxford Immunotec, Abingdon, UK) bzw. die IFN- γ -Konzentration nach

Antigen-Stimulation (Quantiferon, Qiagen) messen, liefert die Durchflusszytometrie zusätzliche Informationen. Jedoch sind sie bisher noch nicht als Routine in den Laboren etabliert (Streitz et al. 2011, Streitz et al. 2012, Borgstrom et al. 2011). Der Tuberkulin-Hauttest (TST) ist inzwischen nicht mehr verfügbar. Es wurde durch die o.g. Tests abgelöst.

In Veröffentlichungen werden eine gute Spezifität und Sensitivität der IGRA sowie keine signifikanten Unterschiede in der Leistung zwischen Röhrchen-Test und ELISPOT beschrieben (Diel et al. 2010). Dies wollten wir überprüfen. Ein neuer ESAT-6-freier IGRA war übrigens in der diagnostischen Performance vergleichbar (Lalvani und Whitworth 2019; Nemes et al. 2019) und wurde durch uns daher nicht separat betrachtet.

Unsere Untersuchungen zur **Wiederholbarkeit der ELISPOT-Tests** im eigenen Labor bestätigen, dass negative Ergebnisse meist wiederholbar sind, positive Werte aber skeptisch betrachtet werden müssen. Laborinterne Fehler wie verwechselte Proben oder Pipettierfehler können mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Medikamente könnten mit den Ergebnissen interagieren, dazu liegen uns aber keine Angaben vor.

Die analytische Sensitivität und Spezifität konnten aus den vorliegenden Daten nur durch die Vermutung abgeleitet werden, dass der Ausfall in der Wiederholungsuntersuchung einen Hinweis auf falsch- oder richtig-positive oder -negative Werte zulässt und die doppelt untersuchten Werte repräsentativ sind. Wir finden auf diese Weise 68 % der positiven Werte als falsch positiv und 10 % der negativen Werte als falsch negativ. Wir fanden unter dieser Bedingung nur eine Sensitivität von 28 %, allerdings eine Spezifität von immerhin 91 %. Beide Werte liegen erheblich unter den Angaben der Literatur und der Hersteller, diese liegen meist bei 84 bis 89 % Sensitivität, die Spezifität mit 86 bis 99 % (Lee et al. 2006).

Anhand **negativer Ergebnisse** ist es mit angemessener Sicherheit möglich, eine bestehende latente Infektion vor Beginn einer immunsuppressiven Therapie weitestgehend auszuschließen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass falsch negative Ergebnisse dennoch auftreten können, noch häufiger sind aber technisch nicht auswertbare Assays. Unerkannte latenten TB-Fälle sind

potenziell ein Risiko für Patienten (Parita et al. 2017). Das Risiko, dass negativ getestete Patienten eine Reaktivierung einer latenten Tuberkulose erleiden, ist dennoch gering.

Ungünstig ist die geringe Sensitivität. Die hohe Anzahl **falsch positiver** Ergebnisse resultiert vermutlich aus der niedrigen Prätestwahrscheinlichkeit in Deutschland (Robert-Koch-Institut 2018), die dazu führt, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass eine positive Probe eingesandt wurde. Die Entscheidung, bei einem positiven Testergebnis zum Beispiel eine INH-Prophylaxe einzuleiten, sollte vom behandelnden Arzt gewichtet und gegebenenfalls durch weitere Verfahren (Röntgen, Erregernachweis, PCR) gestützt werden.

IGRAs sind kein diagnostischer Tuberkulosenachweis, auch wenn sie zum Teil für diesen Zweck verwendet werden. Nur in Ländern mit niedriger TB-Inzidenz können diese Tests bei positivem Ergebnis auch sinnvolle Hinweise auf eine bestehende TB liefern (Teranishi et al. 2020). Die Aussage "positiv" ist nach unseren Untersuchungen bei einer einfachen Messung nicht verlässlich. Interessanterweise gibt es keinen Zusammenhang zwischen der Spot-Zahl bei positiven Ergebnissen und der Bestätigung bei Wiederholungsuntersuchungen. Auch niedrig positive Spot-Zahlen können sich in der Wiederholung als positives Ergebnis bestätigen (Daten nicht gezeigt).

Wichtig ist die Feststellung, dass IGRAs bei akuter TB falsch negativ sein können. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass sich bei einer akuten Tuberkulose die aktivierten Zellen vermehrt am Ort der Infektion aufhalten und eher in BAL-Flüssigkeit zu finden sind als im peripheren Blut (Jafari et al. 2008).

Weiterentwicklungen von IGRA wie der Quantiferon Plus-Test beziehen zusätzliche Antigenpeptide ein. Damit kann zwar die Sensitivität erhöht werden, sie führen aber eher zu zusätzlichen falsch-positiven Fällen (Hogan et al. 2019).

Könnte die Verlässlichkeit des Tests durch wiederholte Analyse verbessert werden? Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass positive Ergebnisse wiederholt werden sollten, insbesondere, wenn keinerlei sonstige Erkrankungszeichen vorliegen. Bei negativen Ergebnissen ist das entbehrlich. Doppelbestimmungen bei der Messung wären eher sinnvoll (siehe unten), dies wird jedoch meist aus finanziellen Gründen vermieden.

Wir fassen also für die Ergebnisse im eigenen Labor folgendes zusammen:

- In unserem Untersuchungsgut ist die Majorität der Proben negativ (85,4 %).
- Negative Untersuchungsergebnisse lassen sich bei uns zu 98 % in einer Wiederholungsuntersuchung verifizieren.
- Positive Untersuchungsergebnisse sind eher selten (10,1 %).
- Die Bestätigung positiver Ergebnisse in einer Wiederholungsuntersuchung gelingt nur in 31,8 % der Proben.
- Es treten stets auch Proben auf, die nicht analysierbar sind (bei uns 4,4 %).

Die **Analyse der IGRA-Ringversuche** ist unseres Wissens die erste derartige Untersuchung. Die Ringversuche von Instand e.V. wurden unter der Nummer 650 zwischen 2012 und 2019 insgesamt 16-mal durchgeführt. Die Ergebnisse der Labore waren in allen Fällen sehr gut. In Veröffentlichungen wurden keine signifikanten Unterschiede in der Leistung zwischen Röhren-Test und ELISPOT beschrieben (Diel et al. 2010). Anekdotische Einzelveröffentlichungen stellen nur minimale Unterschiede heraus und sind mitunter nicht zweifelsfrei ohne wirtschaftliche Interessenkonflikte (Lee et al. 2006). Beim Ringversuch werden frische Proben verschickt, so dass zur Auswertung ein Konsenswert erhoben wird. Diesen erreichen immer sehr viele, mitunter alle Labore. In einem Fall allerdings war dieser Konsenswert unterschiedlich zwischen ELISPOT und Röhren-Test. Hier fand sich bei einer Probe im ELISPOT ein positives Ergebnis, während die Nutzer des

Röhrchen-Tests kein oder ein negatives Ergebnis erhielten. Wir halten das aber als Einzelbefund für keinen Grund, im täglichen Einsatz von Verwendung des einen oder anderen Tests abzuraten.

Aus den analysierten Ringversuchsdaten wurden folgende Aussagen abgeleitet:

- Ringversuche werden von einer großen Anzahl von Laboratorien verwendet, derzeit über 180.
- Die meisten Labore (2019: 85 %) verwenden den Röhrchen-Test. Nur 15 % der Labore arbeiten mit einem ELISPOT.
- Die korrekten Ergebnisse sind zwischen den beiden Testsystemen nicht unterschiedlich verteilt.

Obwohl also die meisten Labore an den Ringversuchen erfolgreich teilnehmen, ist die häufige Anzahl vor allem falsch positiver Ergebnisse im diagnostischen Alltag problematisch. Es wurde daher von uns in einem dritten Untersuchungsschritt die **Validierungsdaten eines Labors** detailliert untersucht, um ein definiertes Verfahren zur Ermittlung positiver Testergebnisse vorzuschlagen. In den in Doppelbestimmung durchgeführten Untersuchungen wurden jeweils die Messungen für die Positiv- und die Negativkontrolle sowie die Werte nach Stimulation mit ESAT-6 und CFP-10 analysiert. Die Differenz der Messwerte der Probe und der Negativkontrolle wurde dann einer kritischen Differenz gegenübergestellt. Diese kritische Differenz entspricht der Durchführung eines statistischen Tests. Als statistischer Test wurde der z-Test zum Vergleich von 2 Mittelwerten herangezogen. Der Test setzt voraus, dass die Standardabweichung bekannt ist. Das ist hier der Fall, die Standardabweichung repräsentiert die Wiederholpräzision. Sie wird als mittlere (gepoolte) Standardabweichung aller probenweisen Standardabweichungen (innerhalb der Replikate) ermittelt. Hierzu ist die Homogenität der Standardabweichungen über alle Proben erforderlich. Dies wird durch die Wurzeltransformation aller Daten

erreicht. Für die Count-Daten ist die Quadratwurzeltransformation anwendbar (Altman 1991, Bland 2000). Daraus folgernd sind alle Berechnungen mit den wurzeltransformierten Daten durchzuführen.

Abbildung 9 zeigt die Abhängigkeit der SD der originalen Daten. Abbildung 10 verwendet die quadratwurzeltransformierten Daten und zeigt deutlich die Homogenisierung der Varianzen durch die Wurzeltransformation. Wie oben dargestellt, ist das die Basis, um die Wiederholbarkeit über die gesamte Breite der Proben durch Poolen der SD zu bestimmen. Für die Untersuchung wurde das „random effects model II ANOVA“, wie in der CLSI guidance EP05-A3 (CLSI 2014) vorgeschlagen, angewendet, wobei die Probe zum Zweck des Poolens der Ergebnisse (je Probe) als zufälliger Faktor in die Berechnung eingeht. Die mittlere Wiederholbarkeit ergibt sich dann aus der residuellen SD (Varga et al. 2017). Diese Wiederholbarkeit kann als Eigenschaft der gewählten Methode betrachtet und muss nur einmal bestimmt werden.

Es ist zu beachten, dass die Testergebnisse pos./neg. von der Anzahl der Wiederholungsuntersuchungen abhängig sind. Die Ergebnisse sollten zusammen mit der Anzahl der Wiederholungen angegeben werden. Je größer die Anzahl der Wiederholungen, desto höher ist die Sensitivität, um positive Testergebnisse zu identifizieren. Aus statistischer Sicht betrachtet kann die Anwendung eines Tests mit $\alpha = 0,05$ dahingehend interpretiert werden, dass die Wahrscheinlichkeit eines falsch positiven Ergebnisses unter 5 % liegt. Bei Verwendung einer hohen Replikatzahl ist zu bedenken, dass die Möglichkeit besteht, dass bei Vorliegen kleiner Messergebnisse es sich nicht um relevante Unterschiede zwischen Proben und negativen Kontrollen handeln könnte.

Für die Testdurchführung lässt sich folgendes zusammenfassen:

- Bei der Datenanalyse ist es sinnvoll, quadratwurzeltransformierte Daten zu verwenden.
- Ausreißer sollten erkannt und mathematisch exakt beschrieben ausgeschlossen werden.
- Es wurde eine durchschnittliche intraserielle Präzision (innerhalb der Replikate) von 0,463 berechnet.
- Der notwendige Unterschied zur Identifizierung positiver Ergebnisse im Vergleich zur Negativkontrolle beträgt bei Doppelmessung 0,7616. Er bezieht sich auf die Differenz (Marker vs. Kontrolle) der Mittelwerte der quadratwurzeltransformierten Zählungen.
- Alle Messungen sollten als Duplikate ausgeführt werden.

Folgende Schlussfolgerungen ergeben zusammenfassend:

1. in der Praxis gibt es keine wesentlichen Unterschiede zwischen ELISPOT und Röhrchen-Test als Testformat, was Sensitivität und Spezifität anbelangt, obwohl sich natürlich die Art der Durchführung stark unterscheidet,
2. IGRAs sind ein ausreichend geeignetes Werkzeug im klinischen Alltag, insbesondere wenn es um den Ausschluss einer latenten Tuberkulose geht,
3. die Auswertung von ELISPOT-Daten lässt sich über Mehrfachbestimmung und quadratwurzeltransformierte Auswertung optimieren (wobei das noch in einer Folgearbeit zu beweisen ist).

Durch Doppelbestimmungen der ELISPOT-Tests lässt sich schon jetzt die Grundlage dafür schaffen, zu einem späteren Zeitpunkt die Daten nochmals zu reanalysieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med. dent.

Untersuchungen zur Eignung von Interferon-gamma release assays
zum Nachweis von *M. tuberculosis*-reaktiven T-Lymphozyten

eingereicht von Bert Müller

angefertigt am Institut für Klinische Immunologie, Medizinische Fakultät der
Universität Leipzig, Johannisallee 30, 04103 Leipzig

betreut von Prof. Dr. Ulrich Sack, PD Dr. Christian Gessner

Juli 2020

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung zellulärer Testsysteme bei Patienten mit Verdacht auf latente Infektion mit *M. tuberculosis*. Eine latente Tuberkulose kann unter Immunsuppression zu einer aktiven Tuberkulose werden. Deshalb wird bei immunsuppressiven Therapien insbesondere mit TNF-alpha-Blockern eine Chemoprävention empfohlen. Daher ist es sehr wichtig, latente Infektionen zu erkennen.

Ist ein Patient mit *M. tuberculosis* infiziert, reagieren seine T-Zellen auf Stimulation mit Antigenen wie ESAT-6 und CFP-10. Diese Immunantwort ist die Grundlage der modernen IFN- γ release Assays (IGRA). ESAT-6 und CFP-10 fehlen bei allen BCG-Stämmen und bei den meisten nicht-tuberkulösen Mykobakterien mit Ausnahme von *M. kansasii*, *M. szulgai* und *M. marinum* (Andersen et al. 2000; Behr et al, 1999; Lalvani 2003). Im

Gegensatz dazu haben Personen, die mit *M. tuberculosis*-Komplex-Organismen infiziert sind, in der Regel T-Zellen im Blut, die diese und andere mykobakterielle Antigene erkennen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Nutzung von IGRA in der medizinischen Labordiagnostik dahingehend zu analysieren, ob es Unterschiede zwischen ELISPOT-basierten Tests und Röhren-Tests als Testformat gibt, inwieweit diese Tests im klinischen Alltag verlässlich sind und ob sich mit einem anderen Auswertalgorithmus eine sicherere Aussage zum Vorliegen einer latenten Tuberkulose treffen lässt.

Im Einzelnen wurden dabei drei Ansätze verfolgt:

1. In einer **retrospektiven Studie** wurden die Ergebnisse von 2686 Patienten ausgewertet, die im Labor des Instituts für Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Leipzig von 2013 bis 2016 als Routineuntersuchungen erhoben wurden. Bei klinisch unplausiblen Ergebnissen wurden bei einem Teil der Patienten eine Wiederholungsuntersuchungen durchgeführt. Die analytische Sensitivität und Spezifität sowie den positiven und negativen prädiktiven Wert konnten wir nur unter der Annahme abschätzen, dass der Ausfall in der Wiederholungsuntersuchung einen Hinweis auf falsch- oder richtig-positive oder -negative Werte zulässt. Wir kommen damit zu einer Sensitivität von nur 28 %, einer Spezifität von immerhin 91 %, einem positiven prädiktiven Wert von 32 % und einem negativen prädiktiven Wert von 90 %. Damit sind 68 % der positiven Werte falsch positiv und 10 % der negativen Werte falsch negativ.

Unsere Untersuchungen zur Wiederholbarkeit der ELISPOT-Tests im eigenen Labor bestätigen, dass negative Ergebnisse meist wiederholbar sind, positive Werte jedoch skeptisch betrachtet werden müssen.

2. Seit 2012 sendet Instand e.V. zweimal jährlich Ringversuchsproben für den IGRA aus (Ringversuch 650, <https://www.instand-ev.de/>). Wir analysierten, wie viele Labors bei **Teilnahme an der externen Qualitätssicherung** (sogenannten Ringversuchen) für IGRA ein korrektes

Ergebnis erzielt hatten und ob Unterschiede zwischen ELISPOT-Assay und Röhren-Test bestehen. Im Ringversuch waren die Ergebnisse von ELISPOT (z.B. TB-Spot, Oxford Immunotec) und Röhrentest (Quantiferon Gold bzw. Gold-Plus, Qiagen oder Diasorin) bis auf den 2. Ringversuch 2019 vergleichbar und unterschieden sich nicht.

3. Obwohl die meisten Labore an den Ringversuchen erfolgreich teilnehmen, ist die recht häufige Anzahl vor allem falsch positiver Ergebnisse im diagnostischen Alltag problematisch. Wir haben daher in einem dritten Untersuchungsschritt die **Validierungsdaten** eines Labors detailliert untersucht, um ein definiertes Verfahren zur Ermittlung positiver Testergebnisse vorzuschlagen. Zwischen 2011 und 2013 erfolgte im Labor Ettlingen eine umfangreiche Qualitätssicherung des ELISPOT unter Nutzung von 70 Proben in Doppelbestimmung. Dabei wurden jeweils die Messungen für die Positiv- und die Negativkontrolle sowie die Werte nach Stimulation mit ESAT-6 und CFP-10 analysiert. Um relevante Unterschiede zwischen Negativkontrolle und der eigentlichen Messung zu bewerten, wurden die Unterschiede mit der Wiederholpräzision in Beziehung gesetzt: Die Unterschiede sollten größer sein als die daraus abgeleitete Ungenauigkeit (Impräzision) der Messungen. Daraus wurde ein Cut-off-Wert kalkuliert, der unmittelbar auf den Daten des Labors beruht. Hierzu ist die Homogenität der Standardabweichungen über alle Proben erforderlich. Sie wird durch die Wurzeltransformation aller Daten erreicht. Für die verwendeten Daten ist sie anwendbar (Altman 1991, Bland 2000). Dies bedeutete bei den untersuchten Daten, dass bei Doppelbestimmungen die Unterschiede zwischen dem Testergebnis immer um den Faktor 0,76 größer sein muss als die Negativkontrolle. Dazu sind allerdings zwei Voraussetzungen zu erfüllen:

1. die Werte müssen vor Analyse wurzeltransformiert werden.
2. benötigt werden mindestens Doppelbestimmungen.

Da keine Doppelbestimmungen vorliegen, konnte das Verfahren nicht an einem eigenen Datensatz verifiziert werden.

Wir schlussfolgern daraus **zusammenfassend**:

1. in der Praxis gibt es keine wesentlichen Unterschiede zwischen ELISPOT und Röhren-Test als Testformat, was Sensitivität und Spezifität anbelangt
2. IGRAs sind ein verlässliches Werkzeug im klinischen Alltag, insbesondere wenn es um den Ausschluss einer latenten Tuberkulose geht
3. die Auswertung von ELISPOT-Daten lässt sich über Mehrfachbestimmung und quadratwurzeltransformierte Auswertung optimieren (wobei das noch in einer Folgearbeit zu beweisen ist).

LITERATURVERZEICHNIS

1. Achkar JM, Ziegenbalg A. Antibody responses to mycobacterial antigens in children with tuberculosis: challenges and potential diagnostic value. *Clin Vaccine Immunol* 2012;19:1898-906.
2. Altman DG. *Practical statistics for medical research*. London: Chapman & Hall CRC, 1991:143pp.
3. American Thoracic Society. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:221-47.
4. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*. 2000;356(9235):1099-104.
5. Anderson BL, Welch RJ, Litwin CM. Assessment of three commercially available serologic assays for detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* and identification of active tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:1644-9.
6. Aubry A, Mougari F, Reibel F, Cambau E. *Mycobacterium marinum*. *Microbiol Spectr*. 2017 Apr;5(2).
7. Barcellini L, Borroni E, Brown J, Brunetti E, Campisi D, Castellotti PF et al. First evaluation of QuantiFERON-TB Gold Plus performance in contact screening. *Eur Respir J* 2016;48:1411-9.
8. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999; 284:1520-3.
9. Berrocal-Almanza LC, Harris R, Lalor MK, Muzyamba MC, Were J, O'Connell AM, Mirza A, Kon O-M, Lalvani A, Zenner D: Effectiveness of pre-entry active tuberculosis and post-entry latent tuberculosis infection in new-entrants to the UK: a retrospective, population-based cohort study. *Lancet Infect Dis* 19 (2019); 1191-1201.
10. Biadlegne F, Tesfaye W, Sack U, Rodloff AC. Tuberculous lymphadenitis in Northern Ethiopia: in a public health and microbiological perspectives. *PLoS One*8(2013);e81918.

11. Biadlegne F, Tesfaye W, Anagaw B, Tessema B, Debebe T, Anagaw B, Mulu A, Sack U, Rodloff AC: Tuberculosis lymphadenitis in Ethiopia. *Jpn J Infect Dis* 66 (2013a);263-8.
12. Biadlegne F, Tessema B, Rodloff AC, Sack U: Magnitude of gene mutations conferring drug resistance in mycobacterium tuberculosis isolates from lymph node aspirates in Ethiopia. *Int J Med Sci* 10 (2013b);1589-94.
13. Biadlegne F, Mulu A, Rodloff AC, Sack U. Diagnostic performance of the Xpert MTB/RIF assay for tuberculous lymphadenitis on fine needle aspirates from Ethiopia. *Tuberculosis (Edinb)* 94(2014);502-5.
14. Biadlegne F, Rodloff AC, Sack U. A first insight into high prevalence of undiagnosed smear-negative pulmonary tuberculosis in Northern Ethiopian prisons: implications for greater investment and quality control. *PLoS One* 9(2014a); e106869.
15. Biadlegne F, Sack U, Rodloff AC. Multidrug-resistant tuberculosis in Ethiopia: efforts to expand diagnostic services, treatment and care. *Antimicrob Resist Infect Control* 3(2014b);31.
16. Biadlegne F, Tessema B, Sack U, Rodloff AC: Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from tuberculosis lymphadenitis patients in Ethiopia. *Indian J Med Res* 140 (2014c);116-22.
17. Biadlegne F, Merker M, Sack U, Rodloff AC, Niemann S. Tuberculous Lymphadenitis in Ethiopia Predominantly Caused by Strains Belonging to the Delhi/CAS Lineage and Newly Identified Ethiopian Clades of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *PLoS One* 10 (2015):e0137865.
18. Biadlegne F, Rodloff AC, Sack U. Review of the prevalence and drug resistance of tuberculosis in prisons: a hidden epidemic. *Epidemiol Infect* 143(2015a);887-900.
19. Bland M. *An Introduction To Medical Statistics*, 2000, Oxford University Press, Oxford New York, pp165, 175
20. Borgstrom E, Andersen P, Andersson L, Julander I, Kallenius G, Maeurer M et al. Detection of proliferative responses to ESAT-6 and

- CFP-10 by FASCIA assay for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. J Immunol Methods 2011;370:55-64.
21. 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.
 22. Chan ED, Heifets L, Iseman MD. Immunologic diagnosis of tuberculosis: a review. Tuberc Lung Dis 2000;80:131-40.
 23. CLSI. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline, 3 ed. Wayn, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
 24. Daniel TM, McDonough JA, Huebner RE. Absence of IgG or IgM antibody response to Mycobacterium tuberculosis 30,000-Da antigen after primary tuberculous infection. J Infect Dis 1991;164:821.
 25. Daniel TM. The history of tuberculosis. Respir Med. 2006;100(11):1862-70.
 26. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. Chest 2010;137:952-68.
 27. 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. 2011; 183(1):88-95.
 28. Feiterna-Sperling C, Brinkmann F., Adamczick C, Ahrens F, Barker M, Berger C, Berthold LD, Bogyi M, von Both U, Frischer T, Haas W, Hartmann P, Hillemann D, Hirsch FW, Kranzer K, Kunitz F, Maritz R, Pizzulli A, Ritz N, Schlags R, Spindler T, Thee S, Weizsäcker K: Consensus-Based Guidelines for Diagnosis, Prevention and Treatment of Tuberculosis in Children and Adolescents. Pneumologie 2017;71: 629–680
 29. 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.

30. 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.
31. 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.
32. Gennaro ML. Immunologic diagnosis of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2000;30(Suppl. 3):S243–6.
33. Gevaudan MJ, Bollet C, Tissot-Dupont H, Charpin D, Mallet MN, De Micco PH. Clinical evaluation of the A-60 IgG and IgM ELISA serodiagnostic test for tuberculosis. *Eur J Epidemiol* 1992;8:666-76.
34. 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.
35. Gupta RK, Lipman M, Jackson C, Sitch A, Southern J, Drobniowski F, Deeks JJ, Tsou C-Y, Griffiths C, Davidson J, Campbell C, Stirrup O, Noursadeghi M, Kunst H, Haldar P, Lalvani A, Abubakar I. Quantitative Interferon Gamma Release Assay and Tuberculin Skin Test Results to Predict Incident Tuberculosis: A Prospective Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med* (2019; Epub ahead of print)
36. Halliday A, Masonou T, Tolosa-Wright M, Mandagere V, Lalvani A: Immunodiagnosis of active tuberculosis. *Expert Rev Respir Med* 13 (2019);521-532.
37. 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.
38. Hogan CA, Tien S, Pai M, Banaei N. Higher Positivity Rate with Fourth-Generation QuantiFERON-TB Gold Plus Assay in Low-Risk

- U.S. Health Care Workers. *J Clin Microbiol.* 2019 Jan 2;57(1). pii: e01688-18.
39. Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis.* 1993;17(6):968-75.
40. Ivanyi J. Serodiagnosis of tuberculosis: due to shift track. *Tuberculosis* 2012;92:31-7.
41. Jafari C, Ernst M, Strassburg A, Greinert U, Kalsdorf B, Kirsten D, Lange C. Local immunodiagnosis of pulmonary tuberculosis by enzyme-linked immunospot. *Eur Respir J* 2008;31:261-5.
42. Kaufmann SHE, Hahn H. *Mycobacteria and TB.* 1. Aufl. Basel: Karger, 2003.
43. Koch, R. Die Aetiologie der Tuberculose. *Berl Klin Wochenschr.* 1882;19(15):221-30.
44. Kohl TA, Niemann S: Implementierung der Genomsequenzierung in der Tuberkulosedagnostik. *Trillium Diagnostik* 2020;18:96
45. Krause AK. Tuberculosis and public health. *Am Rev Tuberc.* 1982;18:271-322.
46. Kreher CR, Dittich MT, Guerkov R, Boehm BO, Tary-Lehmann M. CD4(+) and CD8(+) cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays. *J Immunol Methods* 2003;278:79-93.
47. Krummel K: Evaluation eines neuen Testverfahrens zur Diagnose der latenten Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* bei Umgebungsuntersuchungen. Dissertation Universität zu Lübeck; 2011.
48. Kuhns M, Kohl TA, Maurer FP und Niemann S: Mikrobiologische Diagnostik der Tuberkulose. *Trillium Diagnostik* 2020;18:92
49. 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.
50. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by

- enumeration of antigenspecific T cells. Am J Respir Crit Care Med. 2001a;163(4):824-8.
51. Lalvani A. Spotting latent infection: the path to better tuberculosis control. Thorax, 2003;58(11):916-918.
 52. Lalvani A, Berrocal-Almanza LC, Halliday A. Predicting progression to active tuberculosis: A rate-limiting step on the path to elimination. PLoS Med 2019;16:e1002814.
 53. Lalvani A, Whitworth HS: Progress in interferon-gamma release assay development and applications: an unfolding story of translational research. Ann Transl Med 2019;7, Suppl 3: S128.
 54. Lee JY, Choi HJ, Park I-N, Hong S-B, Oh Y-M, Lim C-M, Lee SD, Koh Y, Kim WS, Kim DS, Kim WD, Shim TS: Comparison of Two Commercial Interferon-Gamma Assays for Diagnosing Mycobacterium Tuberculosis Infection. Eur Respir J 2006;28(1):24-30.
 55. 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.
 56. 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.
 57. Liebeschuetz S, Bamber S, Ewer K, et al. Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T-cellbased assay: a prospective cohort study. Lancet 2004;364:2196-203.
 58. Luelmo F. BCG vaccination. Am Rev Resp Dis. 1982;125(3):70-2.
 59. Luh KT, Yu CJ, Yang PC, Lee LN. Tuberculosis antigen A60 serodiagnosis in tuberculous infection: application in extrapulmonary and smear-negative pulmonary tuberculosis. Respiriology 1996;1:145-51.

60. 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.
61. MacPherson P, Houben RM, Glynn JR, Corbett EL, Kranzer K. Pre-treatment loss to follow-up in tuberculosis patients in low- and lower-middle-income countries and high-burden countries: a systematic review and meta-analysis. *Bull World Health Organ* 2014;92(2):126-38.
62. 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.
63. Manchester K. Tuberculosis and leprosy in antiquity: an interpretation. *Med Hist*. 1984;28(2):162-73.
64. Mantoux C. L'intradermo-reaction e la tuberculine et son interpretation clinique. *Presse Med*. 1910;18:10-13.
65. Mekonnen D, Derbie A, Abeje A, Shumet A, Kassahun Y, Nibret E, Munshea A, Bobosha K, Wassie L, Biadglegne F, Aseffa A, Sack U: Genomic diversity and transmission dynamics of *M. tuberculosis* in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2019;23:1314-1326.
66. Mendel F. Die von Pirquetsche Hautreaktion und die intravenöse Tuberkulinbehandlung. *Med. Klin*. 1908;12:402-4.
67. Menzies RI. Tuberculin skin testing. In: Reichman LB, Hershfield ES. *Tuberculosis: a comprehensive international approach*. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 2000.
68. Meyer-Lüerßen D, Thomas L: Labormedizin: Regelungen für die Erprobung von labordiagnostischen Systemen. *Dtsch Arztebl* 2000;99:A-3312.
69. Min JY, Bang SY, Min SY, Lee DS, Kim BS, Kim JE et al. A Case of Peritoneal Tuberculosis Developed after Infliximab Therapy for Refractory RA. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 2012;73:234-8.

70. 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.
71. Morris K. WHO recommends against inaccurate tuberculosis tests. *Lancet* 2011;377:113-4.
72. Nemes E, Abrahams D, Scriba TJ, Ratangee F, Keyser A, Makhetha L, Erasmus M, Mabwe S, Bilek N, Rozot V, Geldenhuys H, Hatherill M, Lempicki MD, Holm LL, Bogardus L, Ginsberg AM, Blauenfeldt T, Smith B, Ellis RD, Loxton AG, Walzl G, Andersen P, and Ruhwald M: Diagnostic Accuracy of Early Secretory Antigenic Target-6–Free Interferon-gamma Release Assay Compare to QuantiFERON-TB Gold In-tube. *Clin Inf Dis* 2019;69:1724.
73. 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.
74. Parita S, Vivek K, Stephan K, William P, Yizhak K. Infliximab Therapy Leading to Pulmonary Tuberculosis in a Patient With Negative Interferon gamma Release Assay (IGRA)-Based QuantiFERON Gold Test. *J Investig Med High Impact Case Rep* 2017;5:2324709617717540.
75. Pirquet C. Tuberkulin-Diagnose durch cutane Impfung. *Berl Klin Wochenschr.* 1907;44:644-5.
76. Psoma A, Husemann K, Kohlhauf M: Positiver IGRA (T-SPOT.TB®) bei fünf pulmonalen Erkrankungen durch *M. kansasii*. *Pneumologie* 2011; 65 - P163
77. Raviglione MC, Smith, IM. XDR tuberculosis - implications for global public health. *N Engl J Med.* 2007;356:656-9.
78. Raviglione MC, Snider DE Jr., Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA.* 1995;273(3):220-6.
79. Richeldi L. An update an the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(7):736-42.

80. Robert Koch-Institut. Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2017. Berlin 2018
81. Schaberg T, Bauer T, Brinkmann F, Diel R, Feiterna-Sperling C, Haas W, Hartmann P, Hauer B, Heyckendorf J, Lange C, Nienhaus A, Otto-Knapp R, Priwitzer M, Richter E, Rumetshofer R, Schenkel K, Schoch OD, Schönfeld N, Stahlmann R: Tuberculosis Guideline for Adults. *Pneumologie* 2017; 71: 325–397
82. Schubert S. Tuberkulose – Übertragung, Diagnostik und Behandlung. *Ärzteblatt Sachsen* 2018; 3:111-117
83. Senol G, Erer OF, Yalcin YA, Coskun M, Gündüz AT, Biçmen C, et al. Humoral immune response against 38-kDa and 16-kDa mycobacterial antigens in tuberculosis. *Eur Respir J* 2007;29:143-8.
84. Sester M, Sotgiu G, Lange C, et al. Interferon- γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir Journal*. 2011;37:100-111.
85. Small PM, Fujiwara PI. Management of tuberculosis in the United States. *N Engl J Med*. 2001;345(3):189-200.
86. 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.
87. Steingart KR, Henry M, Laal S, Hopewell PC, Ramsay A, Menzies D, et al. Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *PLoS Med* 2007;4:e202.
88. Steingart KR, Henry M, Laal S, Hopewell PC, Ramsay A, Menzies D, et al. A systematic review of commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Postgrad Med J* 2007a;83:705-12.
89. Steingart KR, Flores LL, Dendukuri N, Schiller I, Laal S, Ramsay A, et al. Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: an updated systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2011;8:e1001062.

90. Streitz M, Fuhrmann S, Powell F, Quassem A, Nomura L, Maecker H et al. Tuberculin-specific T cells are reduced in active pulmonary tuberculosis compared to LTBI or status post BCG vaccination. *J Infect Dis* 2011;203:378-82.
91. Streitz M, Fuhrmann S, Thomas D, Cheek E, Nomura L, Maecker H et al. The phenotypic distribution and functional profile of tuberculin-specific CD4 T-cells characterizes different stages of TB infection. *Cytometry B Clin Cytom* 2012;82:360-8.
92. Takwoingi Y, Whitworth H, Rees-Roberts M, Badhan A, Partlett C, Green N, Boakye A, Lambie H, Marongiu L, Jit M, White P, Deeks JJ, Kon OM, Lalvani A on behalf of the Interferon Gamma Release Assays for Diagnostic Evaluation of Active Tuberculosis (IDEA) study group. Interferon gamma release assays for Diagnostic Evaluation of Active tuberculosis (IDEA): test accuracy study and economic evaluation. *Health Technology Assessment* 2019;23: DOI 10.3310/hta23230
93. Teranishi S, Kobayashi N, Aoki A, Katakura S, Yamamoto M, Koizumi H, Kudo M, Kaneko T. Reproducibility of the T-SPOT.TB test for screening Mycobacterium tuberculosis infection in Japan. *J Infect Chemother.* 2020 Feb;26(2):194-198.
94. Tessema B, Beer J, Emmrich F, Sack U, Rodloff AC. First- and second-line anti-tuberculosis drug resistance in Northwest Ethiopia. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012;16:805-11.
95. Tessema B, Beer J, Emmrich F, Sack U, Rodloff AC. Analysis of gene mutations associated with isoniazid, rifampicin and ethambutol resistance among Mycobacterium tuberculosis isolates from Ethiopia. *BMC Infect Dis* 2012;12:37.
96. Tessema B, Beer J, Merker M, Emmrich F, Sack U, Rodloff AC, Niemann S: Molecular epidemiology and transmission dynamics of Mycobacterium tuberculosis in Northwest Ethiopia: new phylogenetic lineages found in Northwest Ethiopia. *BMC Infect Dis* 2013;13:131.

97. Trevethan R: Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Possibilities, and Pitfalls in Research and Practice. *Frontiers Pub Health* 2017;5:307.
98. 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.
99. Varga Z, Lebeau A, Bu H, Hartmann A, Penault-Llorca F, Guerini-Rocco E et al. An international reproducibility study validating quantitative determination of ERBB2, ESR1, PGR, and MKI67 mRNA in breast cancer using MammaTyper(R). *Breast Cancer Res* 2017;19:55.
100. World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO Report 2018. Geneva 2018.
101. World Health Organization. Policy statement: commercial serodiagnostic tests for diagnosis of tuberculosis. WHO; 2011.
102. Ziemann K. Einsatz eines Interferon-Gamma-Release-Assays in der Diagnostik der latenten Tuberkulose bei schwer immunsupprimierten HIV-Patienten. Dissertation Charité – Universitätsmedizin Berlin; 2014
103. 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.
104. Zou YL, Zhang JD, Chen MH, Shi GQ, Prignot J, Cocito C. Serological analysis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis with enzyme-linked immunosorbent assays for anti-A60 immunoglobulins. *Clin Infect Dis* 1994;19:1084-91.

LEBENS LAUF

Name: Müller

Vorname: Bert

Geburtsdatum und -ort: 28.06.1968 in Gera

Nationalität: deutsch

Schulische Ausbildung:

1985-1987 Erweiterte Oberschule Clara-Zetkin Gera – Abitur

1975-1985 Polytechnische Oberschule Karl-Liebknecht Gera

Studium:

2000 Erhalt der zahnmedizinischen Approbation

1988-2000 Medizin und Zahnmedizin in Greifswald und Jena

Fachweiterbildung:

Orale Chirurgie/Implantologie, Kieferorthopädie

Berufstätigkeit:

seit 2002 Niedergelassener Zahnarzt in Holte/Emsland

2000-2002 Assistenz Zahnarzt Praxis Dr. Elstner/Ilmenau

DANKSAGUNG

Ich danke

- PD Christian Gessner und Prof. Ulrich Sack für die Überlassung des Themas und die unermüdliche Betreuung,
- Dr. Andreas Boldt, für die Bereitstellung der retrospektiven Daten im Labor des Institut für Klinische Immunologie,
- Frau Silke Windecker für die Überlassung der Validierungsrohdaten aus Ettlingen,
- Katrin Bauer und Heike Knaack für die Bearbeitung der Elisposts, und
- Dr. Thomas Keller für die umfangreiche Hilfe bei der Analyse der Validierungsdaten.

ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGE ABFASSUNG DER ARBEIT

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....
Datum

.....
Unterschrift

