

Aus dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Präsident: Dr. med. Andreas Zapf

**Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnisse bei
Interferon-gamma-Release-Assays im Grenzbereich**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lisa Annabelle Reinhold

aus München

im Jahr 2018

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Andreas Sing
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Michael Hoelscher
	Prof. Dr. Ludger Klein
	Prof. Dr. Michael Vogeser
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Nikolaus Ackermann
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	26.07.2018

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Abkürzungen.....	V
1. Vorbemerkung.....	1
2. Einleitung.....	2
2.1 Tuberkulose.....	2
2.1.1 Epidemiologie.....	2
2.1.2 Mykobakterien als Erreger der Tuberkulose.....	8
2.1.3 Pathogenese und Stadien der Tuberkulose.....	9
2.1.4 Diagnostische Methoden.....	13
2.1.5 Therapiekonzepte und Prävention.....	17
2.2 Diagnostik der Tuberkulose als Aufgabe des Öffentlichen Gesundheitsdienstes.....	19
3. Grundlagen der Interferon-gamma-Release-Assays.....	23
3.1 Testprinzip.....	23
3.2 Messmethoden.....	24
3.3 Vergleich verschiedener Interferon-gamma-Release-Assays.....	24
3.4 Vergleich von Interferon-gamma-Release-Assays mit dem Tuberkulin-Hauttest.....	26
3.5 Einschränkende Faktoren bei Interferon-gamma-Release-Assays.....	27
4. Datenlage zu Interferon-gamma-Release-Assays.....	28
4.1 Definitionen und Begriffsbestimmungen.....	28
4.2 Vergleich von Interferon-gamma-Release-Assays mit dem Tuberkulin-Hauttest.....	32
4.3 Interferon-gamma-Release-Assays zur Detektion aktiver Tuberkulose.....	33
4.4 Interferon-gamma-Release-Assays zur Detektion der LTBI.....	35
4.5 Reproduzierbarkeit von Interferon-gamma-Release-Assays.....	36
4.6 Fragestellung und Zielsetzung.....	45
5. Material und Methoden.....	47
5.1 Auswahl der Proben.....	47
5.2 Materialien.....	48
5.3 Datenerhebung.....	49
5.3.1 Durchführung des Interferon-gamma-Release-Assays.....	49
5.3.2 Qualitätskontrolle bei Durchführung des Interferon-gamma-Release-Assays.....	51
5.3.3 Interpretation der Ergebnisse des Interferon-gamma-Release-Assays.....	51

5.3.4 Prozedere nach Erhebung der Testergebnisse	54
5.4 Methoden zur statistischen Datenauswertung	54
5.4.1 Methoden zur Auswertung qualitativer Daten	55
5.4.2 Methoden zur Auswertung quantitativer Daten	57
5.4.3 Methoden zur Datensynthese	58
6. Ergebnisse	59
6.1 Ergebnisse der Analyse qualitativer Testresultate.....	60
6.2 Ergebnisse der Analyse quantitativer Testresultate	62
6.3 Synthese qualitativer und quantitativer Ergebnisse.....	65
7. Diskussion	67
8. Schlussfolgerung.....	71
9. Ausblick	72
10. Zusammenfassung.....	73
11. Literaturverzeichnis.....	74
12. Eidesstattliche Versicherung	82
13. Danksagung	83

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schätzungen der weltweiten Tuberkulose-Inzidenzen 2014 (WHO 2015c, 18)	4
Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf der Tuberkulose-Inzidenz von 2002-2014 (modifiziert nach RKI 2015c, 33)	5
Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der Tuberkulose in Deutschland zwischen 2001 und 2013, Inzidenz pro 100.000 Einwohner: Übermittelte Fälle gesamt, Fälle pulmonaler Tuberkulose mit positivem Erregernachweis kulturell und/oder mikroskopisch (offene Form), Fälle ohne Erregernachweis (geschlossene Form), extrapulmonale Tuberkulose (modifiziert nach RKI 2014, 33)	6
Abbildung 4: Tuberkulose-Inzidenz in Deutschland 2014 (Erkrankungen pro 100.000 Einwohner) nach Altersgruppe und Staatsangehörigkeit, N = 4.226 (modifiziert nach RKI 2015c, 19)	7
Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der Tuberkulose-Inzidenz von 2002–2014 getrennt nach deutschen und ausländischen Staatsbürgern (modifiziert nach RKI 2015c, 34).....	7
Abbildung 6: Die verschiedenen Stadien der Tuberkulose (modifiziert nach Böttger 2001, 421)	12
Abbildung 7: Prinzipien der Umgebungsuntersuchungen (modifiziert nach Diel et al. 2011a, 362)	22
Abbildung 8: Vergleich der kommerziellen Interferon- γ -Testverfahren (modifiziert nach Diel et al. 2011a, 366)	25
Abbildung 9: Vergleich der Funktionsprinzipien von THT und IGRA (modifiziert nach Pai et al. 2004, 761)	26
Abbildung 10: Analyse der Korrelation von Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit des Cut-off-Wertes (modifiziert nach Harada et al. 2008, 351; Vogt 2012, 31)	30
Abbildung 11: Positiver prädiktiver Wert (modifiziert nach IBE München, o.J., 10)	31
Abbildung 12: Negativer prädiktiver Wert (modifiziert nach Hofmann et al. 2014, 13)	31
Abbildung 13: Die Analyse des Grenzbereichs um den Cut-off-Wert (modifiziert nach Pai et al. 2009, 10)	39
Abbildung 14: Zu erwartende Normalverteilung der Interferon- γ -Werte im Grenzbereich (modifiziert nach Metcalfe et al. 2013, 209).....	44

Abbildung 15: Herstellung der Standardkurve (modifiziert nach Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 16)	50
Abbildung 16: Interpretation der Ergebnisse des QFT-GIT (modifiziert nach Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 21)	52
Abbildung 17: Flussdiagramm zur Interpretation der Ergebnisse des QFT-GIT (modifiziert nach Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 22)	52
Abbildung 18: Kategorisierung von Cohens-Kappa-Werten (modifiziert nach Altman 1991, 404)	56
Abbildung 19: Differenzierung des Intervalls der Interferon- γ -Antwort von 0,20 IU/ml bis 0,50 IU/ml.....	58
Abbildung 20: Flussdiagramm zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnisse des QFT-GIT im Grenzbereich	59
Abbildung 21: Vierfelderanalyse der qualitativen Testergebnisse von Test 1 und Test 2.....	60
Abbildung 22: Reproduzierbarkeit qualitativer Testergebnisse in Prozent.....	60
Abbildung 23: Reproduzierbarkeit qualitativer Testergebnisse in Zahlen	61
Abbildung 24: Übereinstimmung quantitativer Messergebnisse des QFT-GIT Test 1 versus Test 2	62
Abbildung 25: Bland-Altman-Diagramm der quantitativen Messergebnisse im Grenzbereich	63
Abbildung 26: Die zu erwartende Normalverteilung von Interferon- γ -Antworten im Grenzbereich	64
Abbildung 27: Reproduzierbarkeit von QFT-GIT-Testergebnissen in Abhängigkeit der Interferon- γ -Antwort von Test 1.....	65
Abbildung 28: Prozentuale Verteilung der Diskordanzen in Abhängigkeit der Interferon- γ -Antworten	66

Abkürzungen

BGC:	Bacille-Calmette-Guérin
BiG:	Beschäftigte im Gesundheitswesen
CFP-10:	Culture-filtrate-protein-10
CI:	Konfidenzintervall
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent Assay
ELISPOT:	Enzyme-linked immuno spot Assay
ESAT-6:	Early-secreted-antigenic-target-6
IfSG:	Infektionsschutzgesetz
IGRA:	Interferon-gamma-Release-Assay
IU/ml:	Internationale Einheiten pro Milliliter
LTBI:	Latente tuberkulöse Infektion
MDR- TB:	Multidrug-resistant tuberculosis
MOTT:	Mycobacteria other than tubercle bacilli
PBMC:	Peripheral blood mononuclear cells
PCR:	Polymerase Chain Reaction
QFT-G:	QuantiFERON®-TB Gold
QFT-GIT:	QuantiFERON®-TB Gold In-Tube
QFT-Plus:	QuantiFERON®-TB Gold Plus
RKI:	Robert Koch-Institut
TB:	Tuberkulose
THT:	Tuberkulin-Hauttest
WHO:	World Health Organization
XDR-TB:	Extensively-drug resistant tuberculosis

1. Vorbemerkung

Testverfahren zur Bestimmung der Interferon-Freisetzung aus T-Lymphozyten, sogenannte Interferon-gamma-Release-Assays (IGRAs) haben in den letzten Jahren in der Diagnostik der Tuberkulose immer mehr an Bedeutung gewonnen. Die Tuberkulose ist eine weltweit sehr häufig auftretende Infektionskrankheit, wenngleich sie in den Industrienationen heute aufgrund der verbesserten Lebensumstände und der Einführung wirksamer Chemotherapeutika von geringerer Bedeutung ist als früher. Dennoch tritt die Tuberkulose weiterhin auch in hoch entwickelten Industrienationen wie Deutschland auf, insbesondere bei bestimmten Risikogruppen. In Deutschland führt das Infektionsschutzgesetz die Tuberkulose als meldepflichtige Erkrankung, deren Bekämpfung in der Verantwortung des Öffentlichen Gesundheitsdienstes liegt. Voraussetzung hierfür ist unter anderem die Anwendung präziser diagnostischer Methoden.

Bei Erstuntersuchungen von Verdachtsfällen von Tuberkulose haben IGRAs den früher häufig angewandten Tuberkulin-Hauttest als Tuberkulose-Diagnostikum teilweise abgelöst. Bei IGRAs wird *in vitro* in einer Blutprobe des Patienten nach Kontakt mit Antigenen aus Tuberkuloseerregern die Ausschüttung des Zytokins Interferon- γ aus T-Lymphozyten gemessen, alternativ wird die Anzahl derjenigen Lymphozyten erfasst, die nach Antigenstimulation Interferon- γ sezernieren. Anhand dieser Ergebnisse wird anschließend eine Aussage über das Vorhandensein einer latenten Tuberkuloseinfektion des Patienten getroffen. Zahlreiche Studien bescheinigen den IGRAs gute Ergebnisse im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität, zudem scheinen weitere signifikante Vorteile gegenüber anderen diagnostischen Verfahren wie dem Tuberkulin-Hauttest zu bestehen. Dennoch muss hinterfragt werden, wie ausgeprägt die Verlässlichkeit eines IGRAs hinsichtlich seiner Testvariabilität und Reproduzierbarkeit ist. Dabei sind besonders die Testergebnisse interessant, deren zugrundeliegende Interferon- γ -Werte sich nahe an dem Grenzwert von „negatives Testergebnis“ zu „positives Testergebnis“, dem sogenannten diagnostischen Cut-off-Wert befinden. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass innerhalb eines Grenzbereichs um den Cut-off-Wert mit erhöhter Variabilität des Tests bezüglich der Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnisse zu rechnen ist (Pai et al. 2009, 1ff; van Zyl-Smit et al. 2009, 1ff.). Interessant ist hierbei vor allem die Frage, wie ausgeprägt diese Testvariabilität einzuschätzen ist. Konkret formuliert muss sich ein Anwender von IGRAs fragen, mit welcher Präzision ein IGRA im Falle eines Ergebniswerts, der nahe an diesem Grenzwert liegt, bei einer Testwiederholung mit derselben Patientenprobe dieselben Werte für sezerniertes Interferon- γ erbringt wie bei der ersten Testdurchführung.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Untersuchung der Reproduzierbarkeit eines IGRAs bei Testergebnissen, bei denen die gemessene Immunantwort in Form von Interferon- γ in einem bestimmten Grenzbereich um den vom Hersteller angegebenen Cut-off-Wert liegt und die somit von besonderem Interesse im Hinblick auf die Interpretation der Ergebnisse

sind. Die Bewertung jeglicher medizinischer Testergebnisse setzt ein umfangreiches Wissen um die Anwendbarkeit und Eigenschaften des jeweiligen Verfahrens voraus. Daher soll diese Untersuchung einen Beitrag leisten, wie Testergebnisse von IGRAs, die wegen der Nähe zu dem diagnostischen Cut-off-Wert möglicherweise vorsichtig zu bewerten sind, auf der Grundlage einer validierten Datenlage zu beurteilen sind. Die in dieser Arbeit evaluierten Daten wurden im Rahmen der Untersuchungen von Verdachtsfällen von Tuberkulose in Bayern an der Dienststelle des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim erhoben. Die Laboratorien der Dienststelle des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim übernehmen einen Großteil der Tuberkulosedagnostik des Öffentlichen Gesundheitsdienstes in Bayern. Dafür werden IGRAs angewandt, deren Reproduzierbarkeit im Grenzbereich um den Cut-off-Wert nun im Fokus dieser Untersuchung steht.

2. Einleitung

2.1 Tuberkulose

2.1.1 Epidemiologie

Die Tuberkulose zählt mit ca. 9,6 Millionen Neuerkrankungen und etwa 1,5 Millionen Todesfällen im Jahr 2014 zu den am häufigsten tödlich verlaufenden Infektionskrankheiten weltweit und gilt inzwischen neben der Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) als häufigste Todesursache durch eine Infektionskrankheit (WHO 2015c, 1). Etwa 1,2 Millionen Menschen starben im Jahr 2014 durch das HI-Virus. Diese Zahl beinhaltet fast 400.000 Menschen, die zudem auch an Tuberkulose erkrankt waren (WHO 2015c, 1). Die Tuberkulose wird beim Menschen durch die Infektion mit Mykobakterien des sogenannten *M. tuberculosis*-Komplexes ausgelöst. Die Übertragung des Erregers geschieht aerogen über die Inhalation infektiöser Partikel aus der Luft (WHO 2014a, 17). Weltweit erkrankten 2014 etwa 9,6 Millionen Menschen an Tuberkulose, davon 5,4 Millionen Männer, 3,2 Millionen Frauen und 1,0 Millionen Kinder (WHO 2015c, 1). Geschätzte 12% dieser neuen Tuberkulosefälle im Jahr 2014 betreffen HIV-positive Personen. Die absoluten Zahlen an Neuerkrankungen weltweit sind höher als in früheren Jahren, was die WHO vor allem auf eine verbesserte Datenerfassung zurückführt und weniger auf einen tatsächlichen Anstieg der Verbreitung der Tuberkulose (WHO 2015c, 1). Ein Vergleich mit den Zahlen aus dem Jahr 2013 zeigt mit etwa 1,5 Millionen eine ähnliche Anzahl an Todesfällen durch Tuberkulose wie 2014. Die Zahl der Neuerkrankungen an Tuberkulose wurde im Jahr 2013 auf 9 Millionen Fälle beziffert (WHO 2014a, 17).

Tuberkulose und HIV

Insbesondere HIV-infizierte Personen haben aufgrund der Schwäche der T-Zell-basierten Immunabwehr ein 40-fach erhöhtes Risiko an Tuberkulose zu erkranken, weiterhin begünstigt eine aktive Tuberkulose bei HIV-Infizierten eine schnellere Ausbildung des Vollbilds der Immunschwäche AIDS (Hof 2014, 367). Geschätzte 1,2 Millionen der 9,6 Millionen Menschen, die im Jahr 2014 an Tuberkulose erkrankten, sind zudem HIV positiv, was einer Rate von 12% aller neuen Tuberkulose-Fälle für dieses Jahr entspricht. 74% dieser Fälle der Koinfektion traten in der afrikanischen WHO-Region auf (WHO 2015c, 3).

Seit dem Jahr 2004 ist die Todesrate von Personen, die an HIV-assoziiierter Tuberkulose starben, von 540.000 auf 390.000 im Jahr 2014 gesunken, was einem Rückgang um 32% entspricht (WHO 2015c, 3). Im Jahr 2014 betrug die Anzahl der HIV-positiven Personen, die mit Isoniazid, einem Chemotherapeutikum in der Tuberkulose-Prävention, behandelt wurden, 930.000, was einen Anstieg von 60% im Vergleich zum Jahr 2013 bedeutet. Auf Südafrika fällt mit 59% ein Großteil dieser auf diese Weise therapierten Personen zu (WHO 2015c, 3).

Daten zur Tuberkulose weltweit

Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation WHO beziffern die Infektionsrate mit *Mycobacterium tuberculosis*, dem Haupterreger der Tuberkulose, auf weltweit 2 bis 3 Milliarden Menschen, doch entsteht bei nur etwa 5% bis 15% der Infizierten im Laufe des Lebens eine Erkrankung an Tuberkulose (WHO 2015c, 4). Die Tuberkulose ist die häufigste zum Tode führende therapierbare bakterielle Infektionskrankheit bei Jugendlichen und Erwachsenen sowie die führende Todesursache bei HIV-Infizierten weltweit (RKI 2013, 3). Die weltweite Inzidenz der Tuberkulose betrug im Jahr 2014 133/100.000 Personen (WHO 2015c, 161). Abbildung 1 zeigt eine Einschätzung der WHO zur Verteilung der Inzidenzen nach Ländern im Jahr 2014. Im Jahr 2014 wurden ca. 58% aller neuen Fälle von Tuberkulose in der Südostasienregion und der Westpazifikregion verzeichnet (WHO 2015c, 2). 28% aller Fälle von Tuberkulose fielen 2014 der afrikanischen WHO-Region zu, jedoch traten dort die höchsten Fallzahlen in Bezug auf die Gesamtbevölkerung der Region auf. So kommen in der afrikanischen WHO-Region 281 Tuberkulosefälle auf 100.000 Menschen, was mehr als dem Doppelten der weltweiten Inzidenz von 133 TB-Fällen pro 100.000 Menschen im Jahr 2014 entspricht. Die höchsten prozentualen Anteile der gesamten, weltweiten Fallzahlen traten im Jahr 2014 mit 23%, 10% und 10% in den Ländern Indien, Indonesien und China auf (WHO 2015c, 2).

Die Weltgesundheitsorganisation WHO geht zwar davon aus, dass durch verbesserte Diagnostik und Therapien im Zeitraum von 2000 bis 2014 43 Millionen Todesfälle durch Tuberkulose vermieden werden konnten. Trotz dieser Fortschritte und der Tatsache, dass beinahe alle Fälle von Tuberkulose therapiert werden können, bleibt die Tuberkulose eine der größten Bedrohungen der Menschheit (WHO 2015c, 1). Die WHO schätzt, dass weltweit ca.

64% aller vermuteten Neuerkrankungen detektiert werden, für die WHO-Europaregion werden ca. 80% der Neuerkrankungen als erkannt angegeben (WHO 2014a, 50).

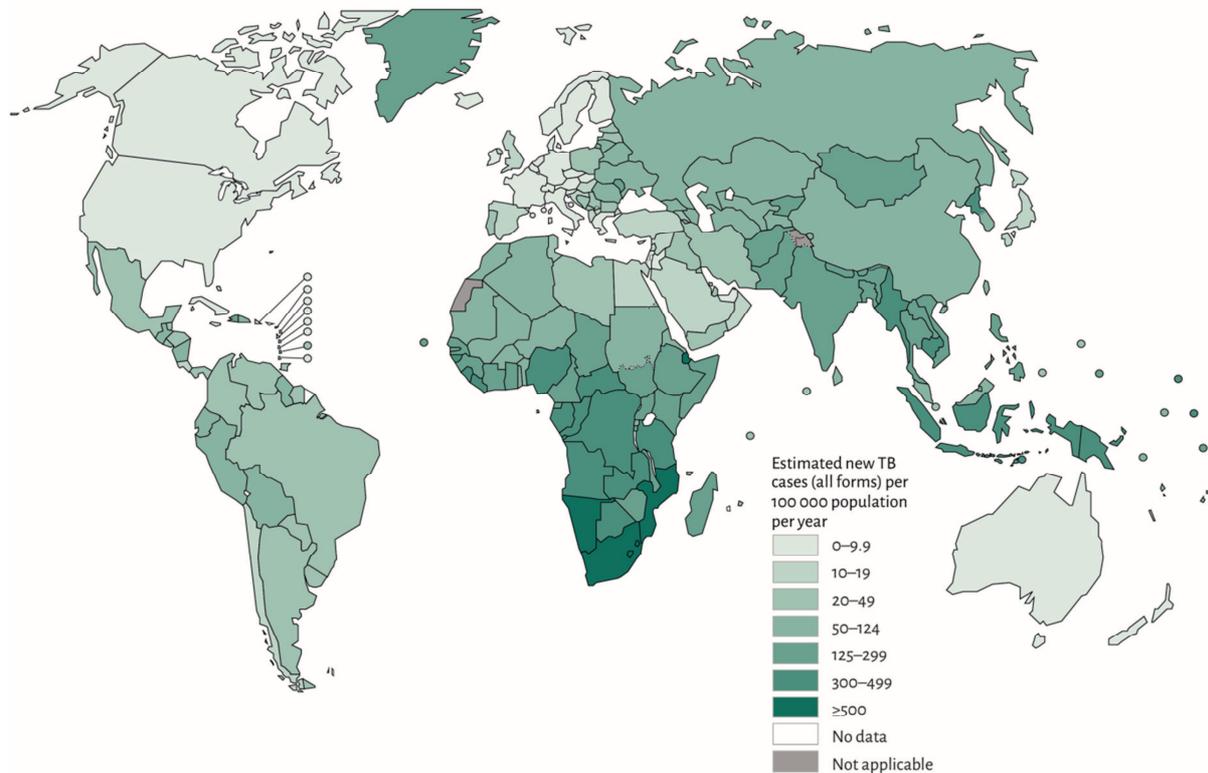


Abbildung 1: Schätzungen der weltweiten Tuberkulose-Inzidenzen 2014 (WHO 2015c, 18)

In der WHO-Europa-Region liegt die Inzidenz für das Jahr 2014 bei 37 Fällen/100.000 Einwohner (WHO 2015c, 152). In Europa lässt sich bei Tuberkulose-Neuerkrankungen ein deutlicher Ost-West-Gradient feststellen, so liegt in Westeuropa die durchschnittliche Inzidenz bei unter 15/100.000, in den Balkanstaaten bei ca. 20/100.000 und in Osteuropa bei über 100/100.000 Einwohner (RKI 2013, 3f.). Die Weltgesundheitsorganisation hat für die kommenden Jahre nach 2015 im Rahmen der „End TB“-Strategie folgende Vorgaben formuliert: Als Meilensteine bis 2025 Reduzierung der Tuberkulose-Toten um 75% und der Tuberkulose-Inzidenz um 50% (entsprechend 55/100.000) im Vergleich zu 2015 und als Ziel bis 2035 Reduzierung der Tuberkulose-Toten um 95% und der Tuberkulose-Inzidenz um 90% (entsprechend <10/100.000) im Vergleich zu 2015 (WHO 2015b, 1f.). Die Vision der WHO ist eine Welt ohne Tuberkulose (WHO 2015b, 1). Bei der Betrachtung dieser epidemiologischen Zahlen wird deutlich, dass der Nutzen einer effektiven Strategie im Hinblick auf präzise Diagnostik und angepasste, wirksame Therapien nicht hoch genug eingeschätzt werden kann. Eine Herausforderung liegt hierbei auch in den weltweit zunehmenden Migrationsbewegungen (RKI 2015a, 84). Erhöhte Mobilität über Ländergrenzen hinweg und das zeitweilige Zusammenleben auf engstem Raum machen deutlich, wie wichtig es ist, eventuell infizierte Personen zu erkennen, den Verdacht auf Tuberkulose durch geeignete Diagnostik gegebenenfalls zu bestätigen und therapeutische Maßnahmen einleiten zu können.

Daten zur Tuberkulose in Deutschland

Im Jahr 2013 wurden 4318 Erkrankungen und eine Inzidenz von 5,3 Fällen/100.000 Einwohner registriert (RKI 2014, 7). Im Jahr 2014 wurden in Deutschland 4488 Erkrankungen an Tuberkulose gemeldet, die entsprechende Inzidenz lag bei 5,6 Fällen/100.000 Einwohner, bei 89 Fällen der im Jahr 2014 erfassten Erkrankten wurde die multiresistente Form (MDR-TB) festgestellt, davon 9 Fälle mit der extensiv resistenten Form (XDR-TB) (RKI 2015c, 11f). Der Anstieg der Fallzahlen des Jahres 2014 gegenüber dem Vorjahr wird vom Robert Koch-Institut mit 3,9% angegeben. Damit rangieren die Fallzahlen von 2014 zwischen den Fallzahlen aus dem Jahr 2008 mit 4538 Erkrankungen und dem Jahr 2009 mit 4442 Erkrankungen (RKI 2015c, 7).

In Deutschland ging die Anzahl der Erkrankungen sowie die Inzidenz seit Jahren stetig zurück, jedoch hat sich seit 2009 der insgesamt rückläufige Trend verlangsamt (RKI 2013, 4). Die Fallzahlen von 2013 wiesen erstmals einen Anstieg um 2,3% gegenüber dem Vorjahr auf und seitdem werden steigende Inzidenzen registriert (RKI 2015c, 7). So wurden dem Robert Koch-Institut im Jahr 2015 bis Mitte November 2015 schon über 4800 Fälle gemeldet (RKI 2015c, 33). Die Entwicklung der Inzidenzen von 2002 bis 2014 ist in Abbildung 2 graphisch dargestellt.

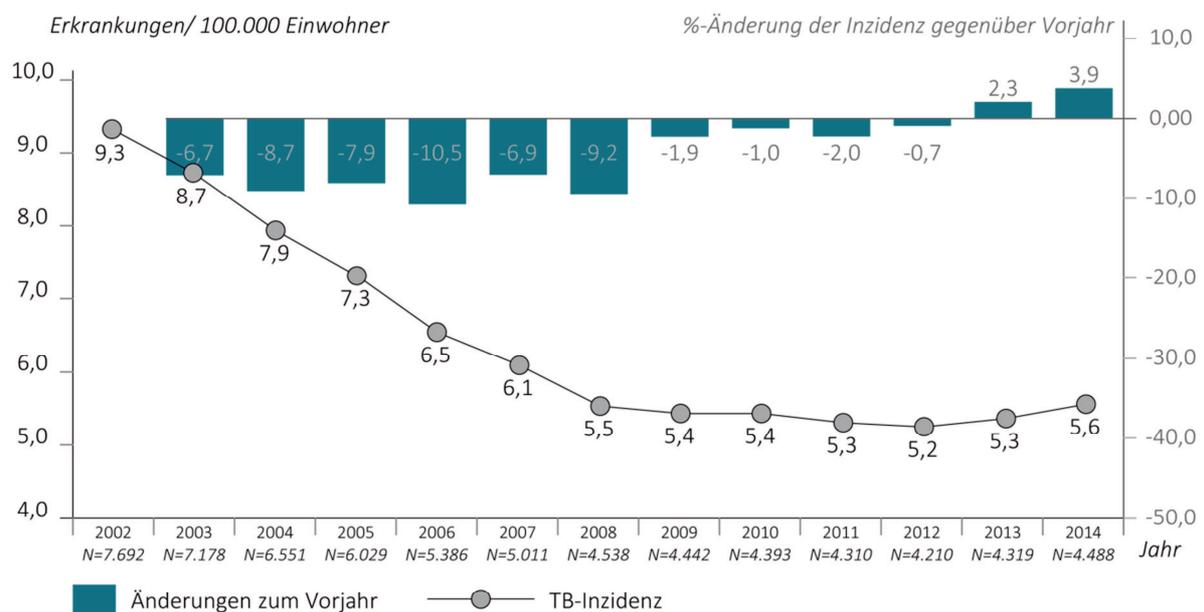


Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf der Tuberkulose-Inzidenz von 2002-2014 (modifiziert nach RKI 2015c, 33)

Der zeitliche Verlauf der Tuberkulose zwischen den Jahren 2001 und 2013 mit den jeweiligen Inzidenzen pro 100.000 Einwohner ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Grafik zeigt neben den für jedes Jahr insgesamt ans Robert Koch-Institut vermittelten Fällen auch eine

Aufschlüsselung der Fälle nach Form der Tuberkulose. So werden Fälle der offenen Tuberkulose mit positivem Erregernachweis durch kulturelle und/oder mikroskopische Nachweismethoden von Fällen der geschlossenen Form ohne Erregernachweis sowie von Fällen mit extrapulmonaler Tuberkulose abgegrenzt (RKI 2014, 33).

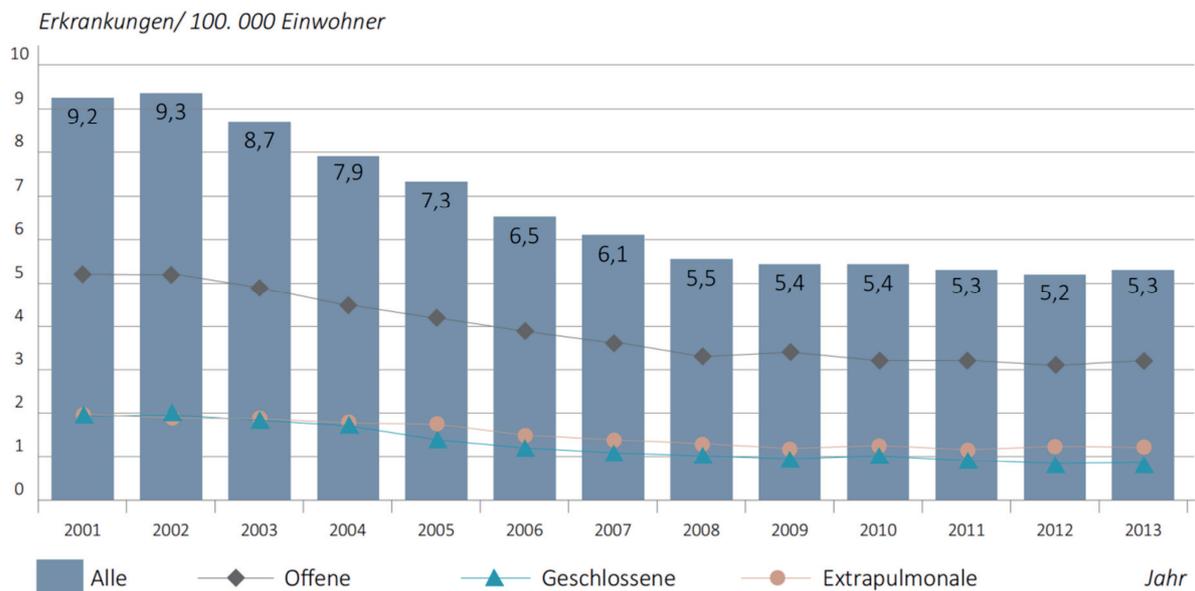


Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der Tuberkulose in Deutschland zwischen 2001 und 2013, Inzidenz pro 100.000 Einwohner: Übermittelte Fälle gesamt, Fälle pulmonaler Tuberkulose mit positivem Erregernachweis kulturell und/oder mikroskopisch (offene Form), Fälle ohne Erregernachweis (geschlossene Form), extrapulmonale Tuberkulose (modifiziert nach RKI 2014, 33)

Risikogruppen bleiben auch in Deutschland weiterhin bestehen, vor allem gefährdet sind Kontaktpersonen von an offener, also infektiöser Tuberkulose Erkrankten, aber auch HIV-Infizierte und immungeschwächte Personen, wie Patienten, die Immunsuppressiva einnehmen (RKI 2013, 4). Drogenabhängigkeit und Obdachlosigkeit sind weitere Risikofaktoren für eine Erkrankung an Tuberkulose. Ein besonders hohes Erkrankungsrisiko haben Migranten aus Ländern, in denen die Tuberkulose sehr häufig ist (RKI 2013, 4).

Dies wird durch die Gegenüberstellung der Inzidenzen in Deutschland von Personen mit deutscher Staatsangehörigkeit und Personen mit ausländischer Staatsangehörigkeit in Abbildung 4 verdeutlicht. Die Inzidenz bei ausländischen Staatsbürgern betrug im Jahr 2014 33,6/100.000 Einwohner und war somit mehr als 13-mal so hoch wie bei deutschen Staatsbürgern, bei denen die Inzidenz 2,5/100.000 betrug (RKI 2015c, 7). Im Vorjahr 2013 war die Inzidenz bei ausländischen Staatsbürgern 10-fach höher als die Inzidenz bei deutschen Staatsbürgern. Von allen Erkrankten, die im Jahr 2014 in Deutschland registriert wurden, besaßen 44,3 % die deutsche Staatsangehörigkeit und 55,7 % eine ausländische Staatsangehörigkeit (RKI 2015c, 7).

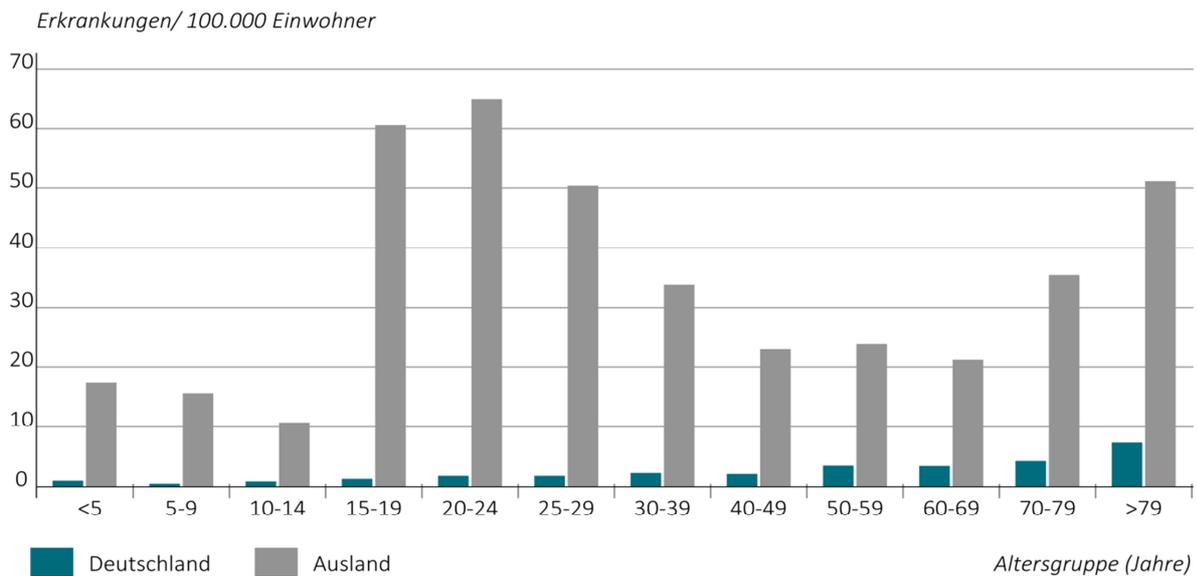


Abbildung 4: Tuberkulose-Inzidenz in Deutschland 2014 (Erkrankungen pro 100.000 Einwohner) nach Altersgruppe und Staatsangehörigkeit, N = 4.226 (modifiziert nach RKI 2015c, 19)

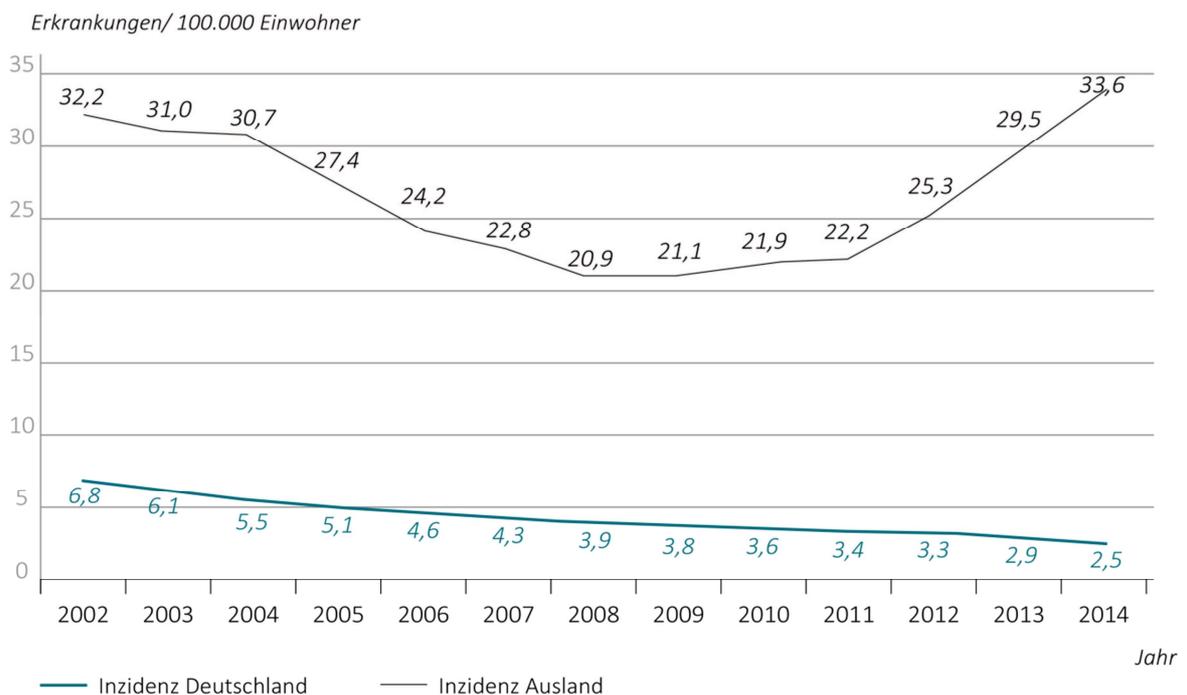


Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der Tuberkulose-Inzidenz von 2002–2014 getrennt nach deutschen und ausländischen Staatsbürgern (modifiziert nach RKI 2015c, 34)

Abbildung 5 veranschaulicht die zeitliche Entwicklung der Inzidenz getrennt nach Personengruppen mit deutscher beziehungsweise ausländischer Staatsangehörigkeit. Hierbei wird ersichtlich, dass sich die Inzidenz bei deutschen Staatsbürgern weiterhin rückläufig entwickelt hat. Im Gegensatz dazu ist die Inzidenz bei ausländischen Staatsbürgern in Deutschland seit 2012 merklich gestiegen (RKI 2015c, 33ff.).

2.1.2 Mykobakterien als Erreger der Tuberkulose

Der Bakteriologe Robert Koch identifizierte im Jahr 1882 Mykobakterien als Erreger der Tuberkulose (RKI 2015b). Mit seinem Vortrag über die „Ätiologie der Tuberkulose“ am 24. März 1882 in der Physiologischen Gesellschaft in Berlin erlangte er internationalen wissenschaftlichen Ruhm. Hervorzuheben ist, dass Robert Koch spezielle Nährböden, neue Kulturbedingungen und Färbetechniken anwenden musste, um den besonderen Krankheitserreger, der nur mit großem Aufwand zu kultivieren und identifizieren ist, entdecken zu können (RKI 2015b).

Mykobakterien sind unbewegliche, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien, die aufgrund ihres Zellwandaufbaus den grampositiven Bakterien zugeordnet werden, jedoch weist die Zellwand einen besonders hohen Lipidgehalt auf, sodass ihre Anfärbbarkeit nach Gram nur schwach ausgeprägt ist (Groß 2013, 59). Da eine anschließende Entfärbung auch mit Säure-Alkohol-Mischungen nicht möglich ist, werden Mykobakterien als säurefeste Stäbchen bezeichnet (Hof 2014, 366). Die wachsartige Beschaffenheit der Zellwand beruht auf langkettigen Fettsäuren wie Mykolsäure, die mit einem Peptidoglykangerüst verknüpft sind. Dieser spezielle Aufbau ist grundlegend für viele Eigenschaften der Mykobakterien. Der Stoffaustausch, und somit auch die Nährstoffversorgung der Bakterien, ist durch die ausgeprägte hydrophobe Zellwandstruktur erschwert (Hof 2014, 366). Dies und die energie- und zeitaufwändige Synthese der speziellen Lipide ihrer Zellwand sind Gründe für das relativ langsame Wachstum von Mykobakterien. Während die meisten Bakterien in Kultur eine Replikationszeit von 20 Minuten aufweisen, können Mykobakterien bis zu 24 Stunden für eine Teilung benötigen (Hof 2014, 366ff.). So teilt sich *M. tuberculosis* etwa alle 12-18 Stunden (Groß 2013, 59). Die eingeschränkte Permeabilität der Zellwand erklärt auch die hohe Widerstandskraft der Mykobakterien gegen chemische und physikalische Umwelteinflüsse wie Magensäure oder Desinfektionsmittel, gegen die Immunabwehr des Wirts und gegen viele Antibiotika (Hof 2014, 366ff.).

Die Tuberkulose wird durch die Vertreter des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes ausgelöst, dazu gehören *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. canettii* und *M. microti* sowie der Impfstamm *M. bovis* BCG (Bacille-Calmette-Guérin) (RKI 2013, 3). Neben diesen Tuberkuloseerregern existieren noch ca. 200 weitere Mykobakterien-Arten, die als MOTT (= mycobacteria other than tubercle bacilli) oder NTM (= nicht tuberkulöse Mykobakterien) klassifiziert werden (zum Beispiel *M. abscessus*, *M. avium* und *M. kansasii*) (Hof 2014, 366f.). Als Haupterreger der humanen Tuberkulose gilt *M. tuberculosis*; *M. bovis* wird durch infizierte Rinder übertragen, etwa durch den Verzehr von Rohmilch, und kann auf diesem Wege beim Menschen Darmtuberkulose verursachen. *M. africanum* ist ein auf dem afrikanischen Kontinent weit verbreiteter Tuberkuloseerreger und wahrscheinlich eine Variante von *M. tuberculosis*. *M. microti*, dessen eigentlicher Wirt die Wühlmaus ist, kann als Tuberkuloseerreger auch den Menschen befallen (Hof 2014, 366f.).

2.1.3 Pathogenese und Stadien der Tuberkulose

Die Pathogenität der Tuberkulose-Erreger basiert im Wesentlichen auf der Induktion einer starken zellvermittelten Immunantwort (RKI 2013, 3). Da die Aufnahme des Erregers meist aerogen über Inhalation infektiöser Partikel stattfindet, ist in mehr als 80% der Fälle die Lunge als Manifestationsort der Infektion betroffen. In diesen Fällen spricht man von einer Primärtuberkulose (Hof 2014, 369f.). Die aerogene Verbreitung der Tuberkuloseerreger geschieht zu einem großen Teil über Husten, wobei das Infektionsrisiko einer Kontaktperson des Infizierten, neben der Intensität und der Dauer des Kontakts, abhängig ist von der Häufigkeit und Stärke des Hustens sowie der Virulenz und Anzahl der abgehusteten Erreger, zudem scheint eine geringe Luftzirkulation in geschlossenen Räumen die Infektionsgefahr zu erhöhen (Diel et al. 2011a, 361; Sepkowitz 1996, 958ff.). Nach Inhalation finden Mykobakterien in den gut belüfteten Lungenspitzen ein aerobes Milieu vor, und vermehren sich extra- und intrazellulär, vor allem in Alveolarmakrophagen (Groß 2013, 256). Allerdings können auch andere Organe infiziert werden, wie Lymphknoten, Urogenitaltrakt, Haut und Gelenke (Hof 2014, 370). Die Lipide und Wachse der Zellwand der Erreger haben nur eine sehr geringe immunogene Wirkung auf den Wirtsorganismus und so führt die Invasion der Erreger in das Gewebe nicht zur klassischen Entzündungsreaktion des infizierten Organismus. Dies erklärt, dass die meisten Infektionen mit Mykobakterien klinisch inapparent verlaufen (Hof 2014, 368). Bei immunkompetenten Patienten kommt es erst nach 3-4 Wochen zur Ausbildung einer T-Zellimmunität (Groß 2013, 257).

Die Pathogenese der Lungentuberkulose beginnt mit der Invasion von Mykobakterien in das Lungengewebe, wo die Erreger zunächst von Alveolarmakrophagen phagozytiert werden (Hof 2014, 368). Die ausgeprägte, säurefeste Lipidschicht ihrer Zellwände schützt die Bakterien vor den aggressiven antimikrobiellen Substanzen im Phagosom, sodass sich die Mykobakterien im Inneren der Makrophagen vermehren können, was letztendlich den Zelltod und den Zerfall der infizierten Makrophagen verursacht (Hof 2014, 368). Anschließend gelangen die freigebliebenen Mykobakterien hämatogen und lymphogen in andere Organstrukturen wie Lymphknoten, wo sie dann wiederum von Makrophagen phagozytiert werden und sich weiter vermehren (Hof 2014, 368). Erst die verzögert einsetzende Wirkung der T-Zell-vermittelten Immunantwort kann die Progression der Infektion aufhalten. Dabei werden die Makrophagen durch T-Lymphozyten mittels Lymphokinen wie Interferon- γ stimuliert, sodass es zur Abtötung der phagozytierten, intrazellulären Mykobakterien kommen kann (Hof 2014, 368). Oftmals bleibt diese Abtötung der Erreger jedoch aus, da keine Fusion der bakterienhaltigen Phagosomen mit enzymhaltigen Lysosomen zustande kommt. Dies wird als intrazelluläre Erregerpersistenz beschrieben (Groß 2013, 257).

Ein typisches Charakteristikum der Infektion mit Mykobakterien ist die Ausbildung von tuberkulösen Granulomen. Sie sind Ausdruck der zellulär vermittelten Immunantwort des Wirts auf die Infektion mit Mykobakterien (Hof 2014, 368f.).

Im Zentrum eines solchen Granuloms bildet sich durch umfassende Zerstörung aller vitalen, zellulären Strukturen eine verkäsende Nekrose. In dem nekrotischen, lipidreichen Material finden Mykobakterien eine Nährstoffgrundlage, die ein längeres Überleben ermöglicht (Hof 2014, 368). Um die zentrale Nekrose herum gruppieren sich Entzündungszellen wie Langhans-Riesenzellen sowie Epitheloidzellen und Granulozyten. Diese Anhäufung der Entzündungszellen ist von einem Wall aus T-Lymphozyten umgeben (Hof 2014, 368). Die T-Lymphozyten bilden Zytokine, welche in den Makrophagen die Bildung antimikrobieller Substanzen stimulieren. Die zentrale verkäsende Nekrose kalzifiziert bei etwa 90% aller Patienten im Laufe der Zeit und ist dann auch radiologisch als Verschattung nachweisbar (Groß 2013, 257; Hof 2014, 368f.). Ein sogenannter Primärkomplex ist dann vorhanden, wenn neben der Diagnose eines tuberkulösen Granuloms auch ein Befall der regionalen Hiluslymphknoten nachweisbar ist (Hof 2014, 369).

Latente tuberkulöse Infektion

Da die Infektionsrate mit *M. tuberculosis* sehr hoch ist, geht die WHO davon aus, dass weltweit ca. 2 Milliarden Menschen latent mit Tuberkuloseerregern infiziert sind (WHO 2015b, 2). Die von der Immunabwehr induzierte Granulombildung verhindert in den meisten Fällen ein Fortschreiten der Infektion, sodass es zu keiner klinischen Symptomatik kommt (Hof 2014, 368f.). Eine vollständige Eradikation der Erreger ist nur sehr selten möglich. Vereinzelt Keime können auch bei Immunkompetenten in den Granulomherden viele Jahre persistieren und vermehren sich dabei kaum, sodass die Infektion inapparent verläuft. Man spricht dann von einer latenten tuberkulösen Infektion (LTBI) (Hof 2014, 368). Da die Bakterien im Granulom eingeschlossen sind, bezeichnet man diese Form auch als „geschlossene Tuberkulose“, infizierte Personen sind dabei nicht infektiös. Kommt es zu einer Schwächung des Immunsystems, insbesondere der T-Zell-basierten Abwehr, z.B. durch hohes Alter, Immunsuppression oder AIDS, kann eine endogene Exazerbation erfolgen (Hof 2014, 368f.). Bei Verdacht auf eine LTBI ist es sinnvoll, diagnostische Maßnahmen durchzuführen, wobei bisher kein Goldstandard zur Detektion einer LTBI existiert (Diel et al. 2011, 364ff.). Aufgrund ihrer Datenlage haben sich IGRAs zum Nachweis einer LTBI als geeignet erwiesen. IGRAs weisen Vorteile gegenüber dem früher häufig durchgeführten Tuberkulin-Hauttest bei der Detektion von LTBI auf (Diel et al. 2011, 359f.). Beim Nachweis einer LTBI kann erwogen werden, chemopräventive Maßnahmen einzuleiten, um der Reaktivierung einer LTBI zu einer aktiven Tuberkulose vorzubeugen. Die präventive Gabe von Isoniazid oder anderen antimykobakteriellen Wirkstoffen kann nach Abwägen des individuellen Risikos einer Reaktivierung und den möglichen Nebenwirkungen der antibiotischen Therapie die Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer aktiven Tuberkulose senken (RKI 2013, 13f.; WHO 2015a).

Aktive Tuberkulose-Infektion

Die Reaktivierung der Bakterien durch Abnahme der Immunabwehr wird bei ca. 10% der Patienten beobachtet (Groß 2013, 257). Diese Reaktivierung tritt bei etwa 5 % der Patienten bereits innerhalb von 5 Jahren nach der Erstinfektion auf. Im weiteren Krankheitsverlauf kann es zur endogen bedingten Sekundärtuberkulose kommen (Groß 2013, 257). Die tuberkulösen Granulome nehmen dabei an Größe zu, zerstören gesundes Gewebe und drainieren in Lungenanteile, die nach außen offen sind. Dabei werden aus dem Inneren der Granulome große Mengen Erreger freigesetzt, die über den Bronchialtrakt im Sputum abgehustet werden können (Hof 2014, 368f.). Man spricht dann von der aktiven oder „offenen Tuberkulose“, die über die Streuung der Erreger durch Husten mit einer hohen Infektionsgefahr für Kontaktpersonen einhergeht. Röntgenologisch kann man in der Lunge höhlenartige Kavernen, in denen sich Mykobakterien stark vermehren, diagnostizieren (Groß 2013, 257). 75% aller klinisch manifesten Tuberkuloseerkrankungen sind auf solche endogenen Reaktivierungen zurückzuführen (Hof 2014, 369).

Eine weitere Form der Sekundärtuberkulose ist die Miliartuberkulose, bei der es zur disseminierten Streuung der Erreger mit massenhaftem Erscheinen von tuberkulösen Granulomen in verschiedenen Organen kommt (Hof 2014, 369f.). Dies tritt auf, wenn die Immunabwehr des Körpers so weit herabgesetzt ist, dass eine Primärtuberkulose nicht auf die Lunge begrenzt bleibt. Begünstigende Faktoren für eine disseminierte Infektion sind HIV-Infektion, hohes Alter, iatrogen bedingte Immunschwäche und Alkoholismus. Je nach Organbefall, Zerstörungsgrad der Gewebe und Vorerkrankungen kann die Prognose der Miliartuberkulose sehr ungünstig ausfallen (Hof 2014, 369f.).

Ohne Therapie ist die Letalität der Tuberkulose hoch. Eine Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2011 analysierte Studien aus der Zeit vor dem Einsatz von Chemotherapeutika zur Bekämpfung der Tuberkulose (Tiemersma et al. 2011, 1ff.). Ergebnisse dieser Analyse zeigen, dass unbehandelte HIV-negative Patienten mit Tuberkulose-Nachweis aus dem Sputum eine Sterblichkeitsrate innerhalb von 10 Jahren von gemittelt 70% aufwiesen. Auch bei kulturell bestätigten Tuberkulosefällen wurde die Sterblichkeitsrate innerhalb von 10 Jahren auf etwa 20% eingeschätzt. Die Dauer der Tuberkuloseerkrankung von Ausbruch bis Heilung oder Tod wurde auf ca. 3 Jahre beziffert (Tiemersma et al. 2011, 1).

Eine Übersicht über verschiedene Stadien der Tuberkulose findet sich in Abbildung 6.

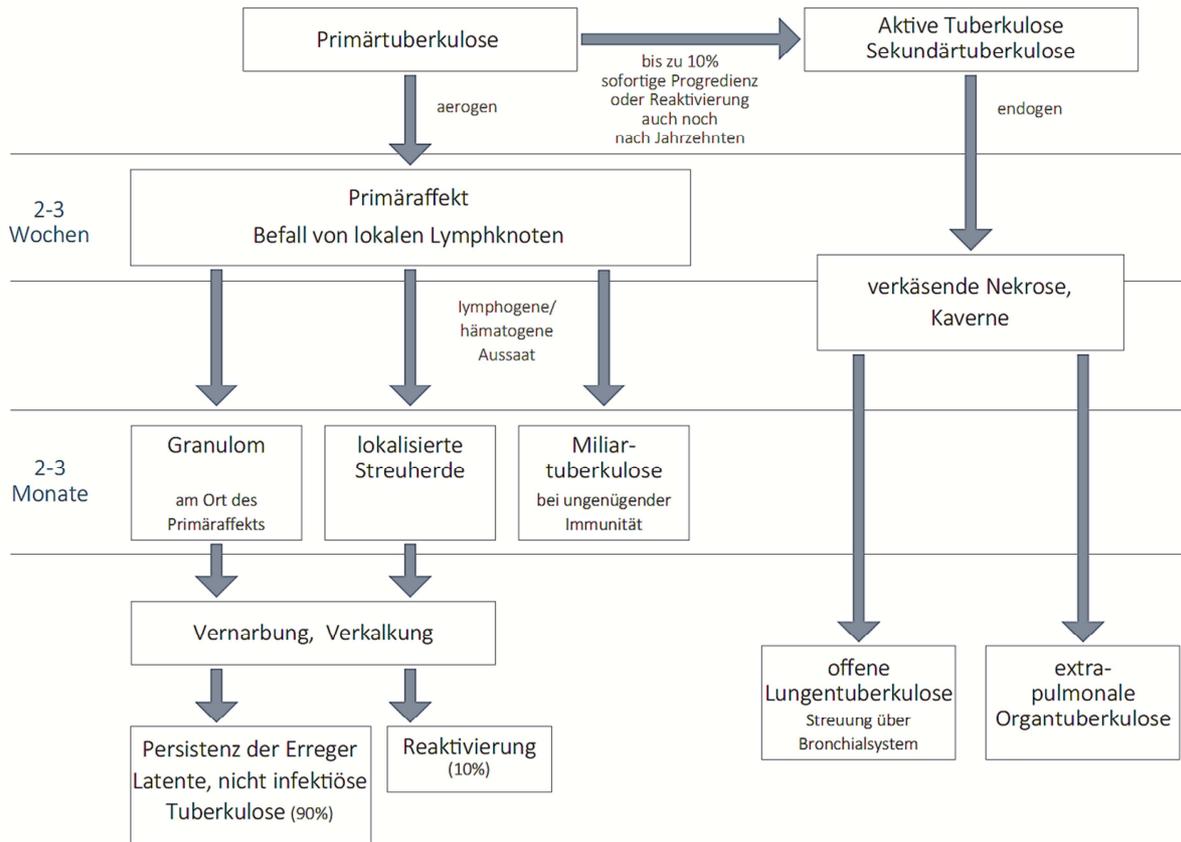


Abbildung 6: Die verschiedenen Stadien der Tuberkulose (modifiziert nach Böttger 2001, 421)

Klinisches Erscheinungsbild

Die klinische Ausprägung der aktiven Tuberkulose beruht im Wesentlichen auf dem Kräfteverhältnis von sich vermehrenden Erregern und deren Eliminierung durch die körpereigene Immunabwehr (Hof 2014, 368f.). Symptome einer klinisch manifesten Tuberkulose sind Fieberzustände und Nachtschweiß, bedingt durch endogene Pyrogene wie IL-1 und TNF-alpha. Daneben kann es bei offener Lungentuberkulose zu chronischem Husten mit Blutbeimengungen im Sputum kommen (Hof 2014, 368f.). Das Symptom der sogenannten „Schwindsucht“, also Gewichtsabnahme, verbunden mit Muskelschwund, ist vergleichbar mit der Kachexie durch AIDS oder maligne Tumoren und beruht auf der Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen auf Osteoklasten, Myozyten und Adipozyten (Hof 2014, 369f.).

2.1.4 Diagnostische Methoden

Die Symptome Nachtschweiß, Fieber und Gewichtsabnahme verbunden mit chronischem Husten mit eventueller Beimengung von Blut im Sputum können Hinweise auf eine Tuberkuloseinfektion sein und erfordern den Ausschluss einer Tuberkulose mittels geeigneter diagnostischer Verfahren (Hof 2014, 370f.). Bei klinisch inapparenten Verdachtsfällen mit einer Expositionsanamnese ist eine LTBI auszuschließen. Bildgebende Verfahren wie Röntgenaufnahmen können angewandt werden, um sowohl in einer akuten Phase der Primärinfektion Rundherde nachzuweisen als auch im weiteren Verlauf der Erkrankung verkalkte Läsionen und luftgefüllte Kavernen mit entsprechender Gewebedestruktion darzustellen (Hof 2014, 370f.). Neben der radiologischen Diagnostik sind direkte und indirekte Nachweismethoden bekannt.

2.1.4.1 Direkte Nachweismethoden

Beweisend für das Vorliegen einer aktiven Tuberkulose ist nur der direkte mikrobiologische Nachweis von *M. tuberculosis*. Methoden, die dafür angewandt werden, sind im Folgenden genannt (Hof 2014, 370f.).

Mikroskopischer Nachweis

Mykobakterien können direkt in Sputum, Trachealsekret, Pleurapunktat, Liquor oder anderen Materialien mikroskopisch nachgewiesen werden. Nach Anfärben mit Ziehl-Neelsen-Färbung, Auramin oder anderen Fluoreszenzfarbstoffen wird das Präparat systematisch untersucht (Hof 2014, 371). Nachteilig ist bei dieser Methode die geringe Sensitivität, insbesondere wenn sich nur wenige Bakterien in der Probe angereichert haben, zudem lässt sich bei Auffinden angefärbter Stäbchenbakterien nur eine Aussage über das Vorhandensein „säurefester Stäbchen“ treffen, nicht aber über die Art der Mykobakterien, sodass nicht zwischen einer Infektion mit *M. tuberculosis* und z.B. MOTT unterschieden werden kann. Auch lassen sich aus der im Präparat nachgewiesenen Keimzahl keine therapeutischen Konsequenzen ableiten (Hof 2014, 371). Aufgrund der geringen Sensitivität darf ein negativer mikroskopischer Befund nicht zum Ausschluss einer Tuberkuloseinfektion führen (Groß 2013, 260). Für eine gesicherte Diagnose muss ein zusätzlicher molekularbiologischer Test mithilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction) durchgeführt werden oder eine kulturelle Anzucht von *M. tuberculosis* erfolgen (Hof 2014, 371).

Molekularbiologischer Nachweis

Die PCR ermöglicht den direkten Nachweis von *M. tuberculosis* aus den verschiedenen Untersuchungsmaterialien außer venösem Blut und Knochenmark (Hof 2014, 371). Die spezifischen Gensequenzen von *M. tuberculosis* können über Amplifizierung in den Patientenproben nachgewiesen werden, sodass auch bei geringer Kolonisation mit *M. tuberculosis* eine endgültige Diagnose erfolgen kann. Sowohl Spezifität als auch Sensitivität sind bei dieser Methode sehr hoch (Hof 2014, 371). Ein positiver molekularbiologischer Nachweis des Erregers ist beweisend für eine aktive und somit infektiöse Tuberkulose (Hof 2014, 371). Nachteilig ist, dass die PCR nicht zu Kontrolluntersuchungen während der Therapie eingesetzt werden kann, da sie auch von Antibiotika bereits abgetötete Bakterien nachweist. Somit eignet sich die PCR nur für Erstuntersuchungen zum Abklären einer Infektion mit Tuberkuloseerregern (Groß 2013, 261).

Kultureller Nachweis

Auch mithilfe der kulturellen Anzucht ist eine Diagnose von Tuberkulose verursachenden Mykobakterien möglich, da diese anhand von speziellen Kulturbedingungen und spezifischen Morphologien von anderen Bakterien unterschieden werden können (Hof 2014, 371f.). Grundsätzlich ist die Kultivierung der Erreger relativ aufwändig. Mykobakterien sind auf lipidhaltige Spezialnährmedien wie z.B. dem Glycerol-Eier-Agar nach Löwenstein-Jensen und auf strikt aerobe Verhältnisse angewiesen (Hof 2014, 371). Mykobakterien zeichnen sich durch ihr langsames Wachstum aus, mit Replikationszeiten von bis zu 24 Stunden. Verhältnismäßig schnell wachsende Arten bilden innerhalb von ca. 1 Woche makroskopisch erkennbare Kolonien. *M. tuberculosis* benötigt eine Kulturzeit von ca. 2 Wochen, *M. bovis* von ca. 3-4 Wochen (Hof 2014, 371f.). Eine finale Differenzierung der Mykobakterienarten in der Kultur gelingt über die unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten und Unterschiede in der Morphologie wie dem Pigmentationsverhalten, zudem können biochemische Leistungen wie die Katalase- und Niacinbildung gemessen werden, die spezifisch für eine Art sind (Hof 2014, 371f.). Bei *M. tuberculosis* fällt der Niacin-Test positiv, bei *M. bovis* negativ aus (Groß 2013, 261). Der kulturelle Nachweis von Tuberkuloseerregern wird als der Goldstandard für die eindeutige Diagnose der Tuberkulose angesehen (Sester et al. 2011, 100).

2.1.4.2 Indirekte Nachweismethoden

Bei einer Infektion mit Tuberkuloseerregern kommt es zu einer Immunreaktion des Wirtskörpers. Um eine Infektion mit *M. tuberculosis* zu diagnostizieren, kann diese abgelaufene Immunreaktion über verschiedene Tests nachgewiesen werden (Hof 2014, 372). Auch bei einer länger zurückliegenden Exposition sind Veränderungen im Immunsystem nachweisbar, die durch den Kontakt mit Tuberkuloseerregern hervorgerufen wurden (Hof 2014, 372). Indirekte Nachweismethoden treffen keine Aussage zu dem Zeitpunkt einer Infektion, außerdem unterscheiden sie nicht zwischen einer aktiven Tuberkulose und einer LTBI (Diel et al. 2011a, 356). Die Nachweismethode mittels Tuberkulin-Hauttest verfügt zudem über eine nur geringe Spezifität, bedingt durch Kreuzreaktivität mit der BCG-Impfung (Diel et al. 2011a, 356). Im Folgenden sind indirekte, also immunologische Nachweismethoden für Tuberkulose aufgeführt.

Tuberkulin-Hauttest

Der Tuberkulin-Hauttest (THT) ist die derzeit am besten evaluierte Nachweismethode für das Krankheitsbild der LTBI. Er beruht auf der Entstehung von Hautveränderungen nach Applikation von Tuberkulin, anhand deren Durchmesser eine Aussage über eine mögliche Infektion mit Tuberkuloseerregern getroffen werden kann (Diel et al. 2011a, 365). Da Verdachtsfälle von aktiver Tuberkulose schnellstmöglich identifiziert und therapiert werden müssen, um eine Ausbreitung der Infektionskrankheit verhindern zu können, werden THTs auch in der Diagnostik der aktiven Tuberkulose verwendet (Sester et al. 2011, 100). Ein Testergebnis ist hierbei wesentlich schneller ablesbar als mit dem zeitaufwändigen kulturellen Nachweis, jedoch kann der THT allein keine definitive Diagnose erbringen. Der THT kann in diesen Fällen mit Thoraxröntgenaufnahmen, PCR und IGRAs kombiniert werden (Sester et al. 2011, 100f.).

Tuberkulin ist eine Mischung gereinigter niedermolekularer Proteine, die aus dem Überstand von Mykobakterienkulturen gewonnen werden. Das Tuberkulin wird an der Beugeseite des Unterarms entweder per Stempel in die Haut eingebracht (Tine-Test) oder intrakutan injiziert (Mendel-Mantoux-Test); nach bereits erfolgter Infektion mit Tuberkuloseerregern bildet sich daraufhin eine verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ IV aus, die mit Induration, Papeln und Bläschenbildung einhergehen kann (Groß 2013, 261; Böttger 2001, 422f.). Diese Effloreszenzen erreichen ihren Höhepunkt zwischen 48 und 72 Stunden nach Applikation, sodass der Ablesetermin nach 72 Stunden bis spätestens nach einer Woche erfolgen sollte (Diel et al. 2011a, 365). Zum Ablesen wird der Durchmesser der Induration gemessen. In Deutschland wird bei Kontaktpersonen von infektiösen Tuberkulosepatienten ein Durchmesser der Induration von mehr als 5mm als positiv beurteilt (Diel et al. 2011a, 365).

Nachteilig an diesem Diagnoseverfahren ist die mangelnde Aussagefähigkeit bei HIV-positiven, iatrogen Immunsupprimierten und Personen im hohen Lebensalter, bei denen es häufig zu falsch-negativen Befunden kommt (Lange et al. 2006, 345). Weiterhin besitzt der Tuberkulin-Hauttest aufgrund der kreuzreaktiven Antigene des Tuberkulins bei BCG-Geimpften keine Aussagekraft (Diel et al. 2011a, 365). Der Impfstoff BCG führt zu einer Tuberkulinkonversion, sodass es zu falsch-positiven Befunden kommt, eine Unterscheidung zwischen infizierten und geimpften Personen ist somit nicht möglich. Tuberkulin-Hauttests können jedoch weiterhin indiziert sein bei Umgebungsuntersuchungen und beim Abklären von klinischen Verdachtsdiagnosen (Groß 2013, 261; Böttger 2001, 427). So wird der THT bei Kindern unter 15 Jahren bei Verdacht auf eine LTBI empfohlen, da die Datenlage bezüglich der Anwendung von IGRAs in dieser Altersgruppe als unzureichend eingestuft wird (Diel et al. 2011a, 366). Als Alternative zum THT, besonders im Hinblick auf die Diagnostik der LTBI, werden seit einiger Zeit IGRAs eingesetzt (Moon, Hur 2013, 221).

Interferon-gamma-Release-Assays

Diagnostische Methoden basierend auf der Ausschüttung von Interferon- γ aus T-Lymphozyten nach Stimulation mit Antigenen tragen seit einigen Jahren vermehrt zur Tuberkulosedagnostik bei. In einer Blutprobe des Patienten wird nach Kontakt der T-Lymphozyten mit Antigenen aus Tuberkuloseerregern die Ausschüttung von Interferon- γ gemessen oder die Anzahl der Lymphozyten erfasst, die Interferon- γ sezernieren (Diel et al. 2011a, 365). Anhand dieser Ergebnisse kann eine Aussage getroffen werden, ob das Immunsystem des Patienten bereits einmal mit Tuberkuloseerregern konfrontiert war. Das Deutsche Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose hebt mit seinen 2011 erschienenen „Neuen Empfehlungen für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose“ die steigende Bedeutung der IGRAs hervor (Diel et al. 2011a, 359ff.). So wird beispielsweise empfohlen, die Erstuntersuchungen bei Kontaktpersonen über 15 Jahren mit IGRAs anstatt dem Tuberkulin-Hauttest durchzuführen und die Indikationsstellung für den Einsatz von IGRAs auf Personen über 50 Jahre bei der Detektion von Fällen mit LTBI zu erweitern (Diel et al. 2011a, 360). Testverfahren mittels IGRA werden im Kapitel 3 „Grundlagen der Interferon-gamma-Release-Assays“ eingehend erläutert.

2.1.5 Therapiekonzepte und Prävention

Die Therapie der aktiven Tuberkulose basiert auf einer mehrmonatigen Kombinationstherapie mehrerer antibiotischer Wirkstoffe, daher unterscheidet sich die Tuberkulose in der Therapie signifikant von anderen bakteriellen Infektionen, die mit einer antibiotischen Monotherapie zu behandeln sind (Hof 2014, 373).

Der spezielle, besonders lipidreiche Zellwandaufbau von Mykobakterien stellt eine Permeabilitätsbarriere für viele Stoffe dar; die geringe Geschwindigkeit der Replikation von Mykobakterien und ihr teils intrazellulärer Lebensraum in Makrophagen stellt die antibiotische Herangehensweise vor Herausforderungen (Hof 2014, 373). Das therapeutische Konzept wird individuell auf den Zustand des Patienten abgestimmt, grundlegend wird dabei immer eine mindestens sechsmonatige Chemotherapie durchgeführt, die, wenn nach zwei Monaten noch Erreger mikroskopisch nachweisbar sind oder eine kavernöse Lungentuberkulose vorliegt, auf neun Monate verlängert wird (Groß 2013, 263).

Antituberkulöse Wirkstoffe werden in Erst- und Zweitrangmedikamente unterteilt, wobei Letztere mit geringerer Wirksamkeit und ausgeprägteren Nebenwirkungen als Erstrangmedikamente einhergehen können (Groß 2013, 262). Zweitrangmedikamente kommen zum Einsatz, wenn Erstrangmedikamente nicht gegeben werden können, zudem dienen sie als Reserveantibiotika. Begonnen wird die Chemotherapie mit einer klassischen 4er-Kombination aus den antituberkulösen Erstrangmedikamenten Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid und Ethambutol, die viele unterschiedliche Angriffspunkte an Mykobakterien aufweisen, unter anderem die Hemmung der Mykolsäuresynthese und der Nukleinsäuresynthese (Groß 2013, 262f.). Nach 2 Monaten kann auf diese Weise die Ansteckungsfähigkeit in 90% der Fälle verhindert werden (Hof 2014, 374).

In der anschließenden Stabilisierungsphase wird auf die Kombination aus Isoniazid und Rifampicin umgestellt (Hof 2014, 373f.). Diese Mehrfachkombinationen sind essentiell, um eine Resistenzbildung zu verhindern. Dennoch sollte bei der Therapie einer Tuberkulose immer ein Antibiogramm erstellt werden (Hof 2014, 373f.).

Bei einer LTBI kann die mögliche Progression und Exazerbation der Erkrankung durch eine chemopräventive Therapie verhindert werden (RKI 2013, 13.). In diesen Fällen ist eine Gabe von Isoniazid über 9 Monate oder von Isoniazid und Rifampicin über 3-4 Monate empfehlenswert, bei der Indikationsstellung müssen jedoch das Risiko für die Entwicklung einer aktiven Tuberkulose und die Möglichkeit unerwünschter Nebenwirkungen beachtet werden (RKI 2013, 13.).

Resistenzbildung

Mykobakterien zeigen seit einigen Jahren eine verstärkte Tendenz zur Resistenzbildung gegen antibiotische Wirkstoffe. Bei der Resistenzentwicklung ist die primäre Resistenz, also die Infektion mit Mykobakterien, die auf natürliche Art gegen bestimmte Antibiotika resistent sind, von der sekundären Resistenz zu unterscheiden (Groß 2013, 263). Bei Letzterer kommt es zur Selektion resistenter Mykobakterien durch unzureichende Wirkkonzentrationen der Antibiotika, mangelnde Compliance des Patienten oder durch Auswahl ungeeigneter antibiotischer Wirkstoffe durch den Behandler (Groß 2013, 263).

Bei der multiresistenten Form der Tuberkulose (MDR-TB) bestehen Resistenzen gegen die Wirkstoffe Isoniazid und Rifampicin, bei extensiv resistenter Tuberkulose (XDR-TB) zusätzlich gegen Fluorchinolone und andere injizierbare Zweitrangmedikamente wie Amikacin (Groß 2013, 263). Wenn, laut Schätzung der WHO, alle im Jahr 2014 registrierten Tuberkulosefälle auf Resistenzen untersucht worden wären, hätte man insgesamt etwa 300.000 Fälle mit MDR-TB detektiert, von denen mit 54% mehr als die Hälfte in Indien, China und der Russischen Föderation anzusiedeln wäre (WHO 2015c, 2). Von den geschätzten 480.000 Fällen von MDR-TB, die im Jahr 2014 aufgetreten sind, wurden wohl nur 123.000 Fälle registriert. Die WHO vermutet, dass MDR-TB 3,3% aller neuen Tuberkulosefälle und 20% aller Fälle, die schon einmal therapiert worden sind, betrifft (WHO 2015c, 2). Im Jahr 2014 starben geschätzt 190.000 Menschen an MDR-TB, Fälle von XDR-TB wurden in 105 Ländern registriert. Es wird vermutet, dass im Jahr 2014 9,7% der Personen mit MDR-TB von XDR-TB betroffen sind (WHO 2015c, 1f.). 2013 wurden durchschnittlich 9% der MDR-TB-Fällen zu den XDR-TB-Fällen gezählt. Am höchsten war dieser Anteil in Litauen (24,8%), Kasachstan (22,7%), Lettland (21,7%) und Georgien (20%). Osteuropäische und zentralasiatische Länder haben mit ca. 35% den höchsten Anteil an MDR-TB-Fällen (WHO 2014b, 4ff.).

Prävention

Die Tuberkulose zählt zu den meldepflichtigen Erkrankungen. Nach Infektionsschutzgesetz (IfSG) sind Erkrankung und Tod durch eine behandlungsbedürftige Tuberkulose vom feststellenden Arzt innerhalb von 24 Stunden dem Gesundheitsamt zu melden, auch wenn kein Erregernachweis vorliegt, zudem muss die Erfassung von Kontaktpersonen erfolgen, um zielgerichtete Umgebungsuntersuchungen zu ermöglichen (§6 IfSG). Der Umgang mit potentiell infektiösen Patienten hat unter entsprechend hygienischen Schutzmaßnahmen zu erfolgen (Groß 2013, 264). Präventiv ist bei infektiösen Patienten mit offener Lungentuberkulose strikte Isolation geboten, bis es nach ca. dreiwöchiger Antibiose mit Rifampicin zu mikroskopisch negativen Sputum-Befunden kommt. Bei Verdacht auf Exposition mit *M. tuberculosis* wird bei bestimmten Personengruppen wie Kindern unter 5 Jahren und Immungeschwächten eine Sekundärprophylaxe mit Isoniazid über 3-6 Monate empfohlen (Groß 2013, 264).

Die Lebendimpfung mit dem Impfstoff BCG wird von der Ständigen Impfkommision des Robert Koch-Instituts seit 1998 nicht mehr empfohlen, da keine ausreichende Wirksamkeit belegt ist und die epidemiologische Situation in Deutschland einem Infektionsrisiko von unter 0,1% entspricht, ein Richtwert, bei dem auch die WHO eine BCG-Impfung nicht mehr empfiehlt (RKI 2012).

2.2 Diagnostik der Tuberkulose als Aufgabe des Öffentlichen Gesundheitsdienstes

Auch wenn Deutschland im Hinblick auf Tuberkulose zu den Niedriginzidenzländern zählt und das Risiko, an einer Tuberkulose zu erkranken, gering ist, konnte diese Erkrankung bisher nicht eliminiert werden und stellt, besonders für Risikogruppen, weiterhin eine Bedrohung dar (RKI 2015a, 89f.). Der Status als meldepflichtige Erkrankung ermöglicht es staatlichen Einrichtungen wie den Gesundheitsämtern, Fallzahlen und Inzidenzen gut zu überblicken. Ein besonderer Fokus liegt bei der Beobachtung von Ausbrüchen an Orten, in denen Personen relativ eng zusammenleben, wie Justizvollzugsanstalten und Aufnahmeeinrichtungen für Asylsuchende (RKI 2015a, 84; RKI 2014, 13).

Bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten ist die Prävention einer Ausbreitung in der Population grundsätzlich von Bedeutung, dies gilt umso mehr für die Tuberkulose, die aerogen verbreitet wird und zunächst oft latent verläuft, daher ist die aktive Fallsuche bei systematischen Umgebungsuntersuchungen von Tuberkulosefällen ein wichtiges Instrument bei der Bekämpfung der Tuberkulose in Deutschland (RKI 2013, 12). Besonders Personen aus Risikogruppen haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, eine aktive Tuberkulose zu entwickeln. Personen mit erhöhtem Infektionsrisiko sind neben Obdachlosen und Drogenabhängigen vor allem Migranten aus Ländern mit hohen Tuberkuloseprävalenzen (RKI 2013, 12).

Der Anstieg der weltweiten Migrationsbewegungen begünstigt neben der zunehmenden Resistenzbildung von Tuberkuloseerregern die Verbreitung von Tuberkulose. Das Risiko, an Tuberkulose zu erkranken, ist sehr hoch bei Menschen, die unter widrigen Bedingungen aus Ländern mit hoher Tuberkulose-Inzidenz und schlechter Versorgungslage immigrieren (RKI 2015a, 84). Besonders bei Flüchtlingen treten als typische Risikoindikatoren für das Auftreten von Tuberkulose eine oft unzureichende ärztliche Versorgung im Heimatland, Mangelernährung, bestehende Vorerkrankungen und das Zusammenleben auf engstem Raum hervor. Aufenthalte in Gemeinschaftsunterkünften oder das Zusammenleben auf engstem Raum können durch starke psychosoziale Belastung zudem die Reaktivierung einer LTBI begünstigen (RKI 2015a, 89). Epidemiologisch betrachtet verringert sich auf diese Weise der Abstand von Regionen mit hoher und niedriger Tuberkuloseinzidenz (RKI 2015a, 84).

In Deutschland werden zur Einhaltung der Infektionshygiene ärztliche Untersuchungen bei Flüchtlingen und Asylbewerbern durchgeführt, welche auch ein Tuberkulose-Screening

vorsehen. Die rechtliche Grundlage dieser Untersuchungen bildet das Infektionsschutzgesetz (IfSG). §36 des IfSG schreibt vor, dass Flüchtlinge und Asylbewerber vor oder unverzüglich nach Aufnahme in eine Gemeinschaftsunterkunft ein ärztliches Zeugnis vorzulegen haben, indem attestiert wird, dass bei ihnen keine Anhaltspunkte für das Vorliegen einer ansteckungsfähigen Lungentuberkulose vorhanden sind (§36 IfSG). Gemäß §62 AsylG sind die Bewohner von Aufnahmeeinrichtungen für Asylbewerber verpflichtet, ärztliche Untersuchungen auf übertragbare Krankheiten einschließlich einer Röntgenaufnahme der Atmungsorgane zu dulden (§62 Abs.1 AsylG). Den Nutzen dieser Maßnahmen belegt beispielhaft eine Studie über ein Tuberkulose-Screening bei Asylbewerbern in Rheinland-Pfalz (RKI 2015a, 88ff.).

Die Grundlage bilden hierbei Daten aus dem Aufnahmescreening in einer Einrichtung für Asylbegehrende in Trier aus den Jahren 2001 bis 2014 (RKI 2015a, 88ff.). Das Screening erfolgte mittels Röntgenaufnahmen des Thorax, sowie bei Personen unter 16 Jahren und Schwangeren mittels THT. Die weltweit zunehmenden Migrationsbewegungen spiegeln sich dabei auch deutlich in den Untersuchungszahlen der Aufnahmeeinrichtung in Trier. So wurden in den Jahren 2001 bis 2013 durchschnittlich 2168 (732-5552) Personen pro Jahr untersucht, im Jahr 2014 waren es 10528 Personen. Hierbei wurden von 2001 bis 2013 im Durchschnitt 7 (2-18) Tuberkulose-Fälle pro Jahr verzeichnet, im Jahr 2014 wurden 47 Fälle diagnostiziert, davon 11 und 9 Fälle aus Somalia und Eritrea sowie jeweils 6 Fälle aus Serbien und Syrien (RKI 2015a, 88f.). Die Aufnahmeuntersuchung ermöglicht eine frühzeitige Diagnose und anschließende Therapie, die, insbesondere bei aktiver Tuberkulose, für den betroffenen Patienten sowie für die Personen in seiner Umgebung von entscheidender Bedeutung sind (RKI 2015a, 89).

Die WHO empfiehlt für Immigranten aus Ländern mit hoher Tuberkuloseprävalenz zudem eine Untersuchung auf LTBI mittels THT oder IGRAs, da sie zu einer Personengruppe gehören, die ein hohes Risiko für die Reaktivierung einer latenten zu einer aktiven Tuberkulose aufweist (WHO 2015a). Daher sollten laut WHO die Aufnahmeuntersuchungen von Asylbegehrenden aus Hochprävalenzländern auch eine Testung auf LTBI beinhalten, um präventiv die Wahrscheinlichkeit einer Reaktivierung zu aktiver Tuberkulose zu senken, wovon sowohl der Betroffene als auch die Gemeinschaft profitieren. Die WHO geht davon aus, dass das Risiko, eine aktive Tuberkulose zu entwickeln, mittels Therapiemöglichkeiten wie 6- oder 9 monatiger Isoniazidgabe, um mindestens 60% gesenkt werden kann (WHO 2015a).

Jedoch können bei einer solchen Herangehensweise neben dem Risiko unerwünschter Arzneimittelwirkungen zudem Probleme auftreten, die durch mangelnde Patientencompliance, räumliche Umverteilung von Asylsuchenden und Probleme beim Zugang zu medizinischer Versorgung entstehen; für Deutschland besteht derzeit keine Empfehlung für ein generelles Screening auf LTBI bei Immigration, da die Vorteile einer solchen Untersuchung nicht ausreichend belegt sind (RKI 2015a, 90). In Deutschland gehören Screening-Untersuchungen auf eine Tuberkulose-Infektion sowie

Umgebungsuntersuchungen bei Verdachtsfällen und die Initiierung geeigneter Therapien zu den Aufgabengebieten des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (RKI 2015a, 84). Die Dienststelle des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim erhält Einsendungen von Blutproben durch Gesundheitsämter, niedergelassene Ärzte und aus Gemeinschaftseinrichtungen, um diese auf eine mögliche Tuberkuloseinfektion zu testen.

Ein Leitfaden für das Vorgehen bei diesen Untersuchungen sind hierbei die im Jahr 2011 vom Deutschen Zentralkomitee zur Bekämpfung der Tuberkulose herausgegebenen aktualisierten Richtlinien für das Vorgehen bei Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose. Die unter dem Titel „Neue Empfehlungen für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose“ (Diel et al. 2011a, 359–378) veröffentlichten Empfehlungen sollen in erster Linie der Qualitätssicherung bei der Durchführung der im Infektionsschutzgesetz vorgeschriebenen Untersuchungen bei Verdacht auf Tuberkulose dienen. Die Empfehlungen stützen sich auf neu gewonnene Erkenntnisse zu den In-vitro-Testverfahren zur Diagnose der LTBI, einem Krankheitsbild das im Rahmen von Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose von Bedeutung ist. Wesentliche Punkte der aktualisierten Empfehlungen für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose sind im Folgenden aufgeführt (Diel et al. 2011a, 360):

- Die primäre Untersuchung mit IGRAs statt des THT bei Kontaktpersonen über 15 Jahren
- Eine erweiterte Indikationsstellung für den Einsatz von IGRAs bei der Detektion von Personen mit LTBI auf Personen über 50 Jahre

Bei Kontaktpersonen über 15 Jahren spricht die Datenlage für die ausschließliche, routinemäßige Anwendung von IGRAs, da ausreichend Studien zu dem Ergebnis kommen, dass IGRAs in dieser Altersgruppe eine signifikant höhere Sensitivität als der THT aufweisen (Diel et al. 2011a, 366). So bewerten beispielsweise Sester et al. in einer Meta-Analyse über 27 Studien die Sensitivität des THT mit 65%, die des QuantiFERON®-TB Gold In-Tube mit 80% und die des T-SPOT.TB® mit 81%, wobei die Autoren nur Studien berücksichtigten, die zudem die Spezifität bei aktiver Tuberkulose bestimmten (Diel et al. 2011a, 366; Sester et al. 2011, 100ff.). Würde der Öffentliche Gesundheitsdienst bei Erwachsenen den THT als vorgeschaltetes Screening vor einem IGRA durchführen, so käme es zur Nichterfassung von ca. 13%-17% der *M. tuberculosis*-Infizierten, die anschließend nicht mehr mittels IGRA getestet werden würden (Diel et al. 2011a, 368).

Bei Kindern unter 15 Jahren, die an Tuberkulose erkrankt sind, findet sich häufig eine nur geringe Erregerdichte (Diel et al. 2011a, 366). Die Datenlage zur Sensitivität von IGRAs bei Kindern unter 15 Jahren mit kulturell nachgewiesener Tuberkulose ist noch nicht ausreichend. Eine Analyse von Diel et al. zur Anwendung von IGRAs bei Kindern unter 15 Jahren, bei der sieben Studien berücksichtigt wurden, ergab eine gemittelte Sensitivität von 84,9% für den THT, mit dem insgesamt 146 durch Kultur verifizierte Tuberkulosen bestätigt wurden und

jeweils eine Sensitivität von 84,6% mit 124 bestätigten Fällen bzw. eine Sensitivität von 75% mit 112 bestätigten Fällen bei der Anwendung zweier IGRAs (Diel et al. 2011a, 366). Daher wird empfohlen, bei Umgebungsuntersuchungen Kinder von 5 bis 15 Jahren mittels THT oder IGRA zu untersuchen. Bei Kindern unter 5 Jahren besteht keine ausreichende Datenlage zur Anwendung von IGRAs, sodass in dieser Altersgruppe bei Kontaktpersonen weiterhin der THT verwendet wird (Diel et al. 2011a, 370f.).

Die Ziele von Umgebungsuntersuchungen sind neben der Detektion von infizierten Personen auch die Aufdeckung von Infektionsketten sowie die Verhütung der Weiterverbreitung der Krankheit (Diel et al. 2011a, 362). Im Fokus steht der sogenannte Indexpatient, also derjenige bestätigte Tuberkulosekranke, der als Auslöser der Umgebungsuntersuchung gilt. Bei der Umgebungsuntersuchung wird einerseits sowohl nach Kontaktpersonen, die als Infektionsquelle des Indexpatienten in Frage kommen (zentripetale Richtung), als auch andererseits nach Kontaktpersonen des Indexpatienten, die als ansteckungsverdächtig gelten (zentrifugale Richtung), gesucht (Diel et al. 2011a, 362). Die Prinzipien der Umgebungsuntersuchungen sind in Abbildung 7 graphisch dargestellt.

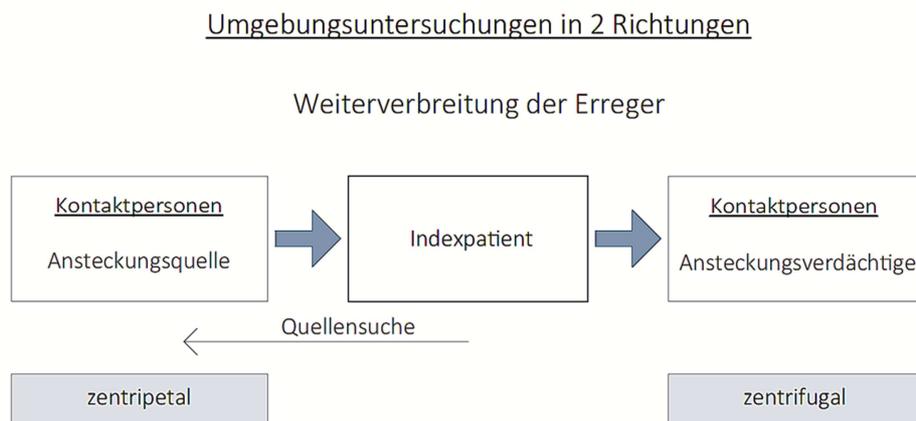


Abbildung 7: Prinzipien der Umgebungsuntersuchungen (modifiziert nach Diel et al. 2011a, 362)

3. Grundlagen der Interferon-gamma-Release-Assays

3.1 Testprinzip

Ist eine Person mit einem Erreger aus dem *M. tuberculosis*-Komplex infiziert, so wird bei Immunkompetenten die T-Zell basierte Immunabwehr aktiviert (Hof 2014, 367f.). T-Lymphozyten erkennen Antigene der Tuberkuloseerreger und stimulieren daraufhin andere Zellen des Immunsystems wie z.B. Makrophagen. Als Botenstoff fungiert hierbei das Zytokin Interferon- γ , das von den T-Lymphozyten sezerniert wird. Das Immunsystem des Wirts kann auf diese Weise die Erregerzahl wirksam reduzieren, sodass es zu keiner aktiven Tuberkulose kommt (Hof 2014, 367f.). IGRAs basieren auf dieser Eigenschaft der T-Lymphozyten, nach Antigenkontakt die Sekretion von Interferon- γ einzuleiten (Hof 2014, 372). Die bei IGRAs verwendeten spezifischen Antigene stammen aus der RD-1 (region of difference) des Genoms von *M. tuberculosis*. Diese Antigene fehlen bei den anderen Mykobakterienarten bis auf *M. kansasii*, *M. marinum* und *M. szulgai* (Lange et al. 2006, 346). Der Zeitraum zwischen Exposition mit *M. tuberculosis* und nachweisbarer Konversion von IGRAs liegt bei 4-7 Wochen, wobei in Einzelfällen auch erst 14-22 Wochen nach Exposition eine Konversion des IGRAs aufgezeichnet werden konnte (Lee et al. 2011, 1451).

Zur Durchführung eines IGRAs wird venöses Blut gewonnen und dieses in vitro mit den für *M. tuberculosis* spezifischen Antigenen ESAT-6, CFP-10 sowie testabhängig auch TB7.7 versetzt (Moon, Hur 2013, 222f). Hatte der Patient schon einmal Kontakt zu Antigenen von *M. tuberculosis*, bilden T-Lymphozyten das Zytokin Interferon- γ . Eine Möglichkeit, eine Infektion mit *M. tuberculosis* nachzuweisen, ist, direkt die Menge an sezerniertem Interferon- γ nach Stimulation der T-Lymphozyten durch Antigene von *M. tuberculosis* mittels ELISA zu quantifizieren (Hof 2014, 372). Eine Alternative zum Nachweis der Infektion mit *M. tuberculosis* besteht darin, die Anzahl Interferon- γ -produzierender T-Lymphozyten nach Antigenkontakt mittels ELISPOT zu bestimmen (Diel et al. 2011a, 366). Weiterhin ist es bei IGRAs immer erforderlich, eine Positivkontrolle durchzuführen, um eine normale Funktion der T-Zell-vermittelten Immunantwort sicherzustellen. Die Positivkontrolle wird über den Zusatz von Phythämagglutinin erreicht (Hof 2014, 372f.). Eine Negativkontrolle ohne Antigenstimulation ist erforderlich, um die Menge an Interferon- γ zu evaluieren, die bereits ohne externe Stimulation von den T-Lymphozyten sezerniert wird (Moon, Hur 2013, 222).

3.2 Messmethoden

ELISA

Das Testverfahren ELISA (enzyme-linked immunosorbent Assay) beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion (Kaufmann 2009, 69). Beim Nachweis von Interferon- γ im Zusammenhang mit einem IGRA, sind die Kunststoffoberflächen der Mikrotiterplatten, mit denen ELISA durchgeführt wird, mit Antikörpern gegen humanes Interferon- γ beschichtet. Das nachzuweisende Interferon- γ bindet als Antigen zunächst an Primärantikörper und danach an Sekundärantikörper, wobei letztere mit einem Enzym wie Peroxidase oder Phosphatase markiert sind (Kaufmann 2009, 69). Ungebundene Antikörper werden durch Waschen eliminiert. Nach Zugabe von Substrat kommt es zu einer Reaktion, welche eine Verschiebung des pH-Wertes der Lösung bewirken kann. Diese Veränderung kann über Farbindikatoren optisch sichtbar gemacht werden. Mithilfe eines Photometers kann somit die Konzentration von Interferon- γ quantifiziert werden (Groß 2013, 95; Kaufmann 2009, 69).

ELISPOT

Das Testverfahren ELISPOT (enzyme-linked immuno spot Assay) dient dem Nachweis antigenproduzierender Zellen (Kaufmann 2009, 69). Als Antigen fungiert im Zusammenhang mit der Verwendung eines IGRAs das von T-Lymphozyten sezernierte Interferon- γ . Entsprechende zugegebene Antikörper bilden einen Komplex mit Interferon- γ . Vergleichbar mit ELISA werden die Antikörper mit einem Enzym markiert, dessen anschließende Reaktion mit einem Substrat sichtbar gemacht werden kann. Diese sichtbaren Punkte entstehen an den Stellen der Antigenbindung und sind somit ein Maß für die Anzahl der Interferon- γ sezernierenden T-Lymphozyten (Kaufmann 2009, 69).

3.3 Vergleich verschiedener Interferon-gamma-Release-Assays

In Deutschland finden zurzeit vor allem zwei kommerziell erhältliche IGRAs von unterschiedlichen Herstellern Anwendung. Der QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube (QFT-GIT) der Firma Cellestis, a QIAGEN Company, Chadstone, Australien wurde im Jahr 2007 entwickelt. Als Weiterentwicklung seiner Vorgänger, dem ersten Quantiferon-Test aus dem Jahr 2001 und dem modifizierten QuantiFERON[®]-TB Gold (QFT-G), kommt beim QFT-GIT das zu untersuchende Blut bereits direkt in den Blutentnahmeröhrchen mit den spezifischen TB-Antigenen in Kontakt (Moon, Hur 2013, 222). Beim QFT-GIT wird nach Stimulation der T-Lymphozyten durch die spezifischen Antigenpeptide ESAT-6, CFP-10 und TB 7.7 mittels ELISA direkt die Interferon- γ -Konzentration im Vollblut gemessen (Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 4ff.).

Die Firma Oxford Immunotec, Abingdon, Großbritannien hat mit dem T-SPOT.TB[®], einen anderen Ansatz verfolgt. Nachdem periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) aus dem Vollblut des Patienten isoliert wurden, werden diese zusammen mit den spezifischen Antigenen ESAT-6 und CFP-10 inkubiert, anschließend wird mittels ELISPOT die Anzahl Interferon- γ -produzierender T-Lymphozyten bestimmt (Oxford Immunotec Limited 2013, 1ff.). Den hier beschriebenen IGRAs ist gemeinsam, dass die verwendeten Antigenpeptide ESAT-6, CFP-10 sowie TB7.7 (nur bei QFT-GIT) neben *M. tuberculosis* auch bei *M. kansasii*, *M. szulgai* und *M. marinum* vorkommen können, da auch diese Mykobakterienarten Gene aufweisen, die für diese Proteine kodieren. So kann ein positives Testergebnis dieser IGRAs neben einer Infektion mit Mykobakterien aus dem *M. tuberculosis*-Komplex auch durch eine Infektion mit *M. kansasii*, *M. szulgai* oder *M. marinum* bedingt sein (Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 4ff.; Oxford Immunotec Limited 2013, 1ff.).

Abbildung 8 zeigt eine tabellarische Gegenüberstellung der Merkmale der kommerziell erhältlichen Interferon- γ -Testverfahren QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube und T-SPOT.TB[®].

	QuantiFERON-Tb [®] Gold In-Tube	T-SPOT.TB [®] Test
<i>Hersteller</i>	Cellestis/Qiagen	Oxford Immunotec
<i>Testmedium</i>	Vollblut	PBMC
<i>Antigene</i>	In-vitro-Stimulation mit ESAT-6, CFP-10 und TB 7.7 im beschichteten Röhrchen	In-vitro-Stimulation von isolierten Lymphozyten mit ESAT-6 und CFP-10
<i>Messmethode</i>	ELISA	ELISPOT
<i>gemessene Zielgröße</i>	Konzentration von sezerniertem Interferon- γ in (IU/ml)	Interferon- γ produzierende T-Zellen („Spots“) pro 250 000 Zellen
<i>benötigtes Blutvolumen</i>	3 ml	Erwachsene und Kinder \geq 10 Jahre: 8ml Kinder 2 – 9 Jahre: 4ml Kinder bis zu 2 Jahre: 2ml Immunsupprimierte: 16 ml
<i>Inkubation</i>	16 – 24 Std. bei 37 ° C	16 – 20 Std. bei 37 ° C (mit 5% CO ₂)
<i>Zeitfenster nach Blutentnahme bis zur Weiterverarbeitung im Labor</i>	Lagerung der Blutentnahmeröhrchen für bis zu 16 Std. nach Blutentnahme bei Raumtemperatur vor der Inkubation	max. 8 Std. bei Raumtemperatur
<i>Test gilt als positiv, wenn</i>	(TB Ag – Negativkontrolle) \geq 0,35 IU/ml (Konzentration Interferon- γ) und (TB Ag – Negativkontrolle) \geq 25% der Negativkontrolle	Negativkontrolle $<$ 5 Spots und Panel A (CFP-10) oder Panel B (ESAT-6) – Nil \geq 6 Spots pro 250 000 Zellen Panel A oder Panel B – Nil = 5,6,7 Spots gilt als Graubereich: Testwiederholung mit neuer Probe empfohlen
<i>Test gilt als nicht interpretierbar, wenn</i>	Resultat pos. Kontrolle minus neg. Kontrolle $<$ 0,5 IU/ml und Resultat TB-Antigen minus neg. Kontrolle $<$ 0,35 IU/ml oder Resultat pos. Kontrolle minus neg. Kontrolle $<$ 0,5 IU/ml und Differenz zwischen TB-Antigen und neg. Kontrolle $<$ 25% oder neg. Kontrolle $>$ 8,0 IU/ml	pos. Kontrolle $<$ 20 Spots oder neg. Kontrolle $>$ 10 Spots

Abbildung 8: Vergleich der kommerziellen Interferon- γ -Testverfahren (modifiziert nach Diel et al. 2011a, 366)

3.4 Vergleich von Interferon-gamma-Release-Assays mit dem Tuberkulin-Hauttest

Ein Vorteil der IGRAs gegenüber dem Tuberkulin-Hauttest ist, dass die Lymphozytenstimulationstests nicht von einer BCG-Impfung beeinflusst werden, da die spezifischen Antigenpeptide ESAT-6, CFP-10 und TB 7.7 aus *M. tuberculosis* dem Impfstamm BCG und den meisten nicht tuberkulösen Mykobakterien fehlen (Groß 2013, 261; Diel et al. 2011a, 365). Ein weiterer Vorteil gegenüber dem THT ist, dass Anwendungsfehler bei der Applikation und Schwierigkeiten bei der Interpretation von Hautveränderungen vermieden werden, weiterhin muss der Patient zur Blutabnahme für den Test nur einmal erscheinen und das Testergebnis ist objektiv und eindeutig ablesbar (Diel et al. 2011a, 366).

Was den Zeitpunkt der frühestmöglichen Nachweisbarkeit einer Interferon- γ -Ausschüttung nach Lymphozytenstimulation angeht, so liegt dieser mit ca. 8 Wochen nach letztmaligem Kontakt zum Indexpatienten bei einem ähnlichen Zeitpunkt wie der Nachweis einer Tuberkulinkonversion beim THT (Anibarro et al. 2011, 215ff.). Eine vergleichende Darstellung der Funktionsweise von THT und IGRA findet sich in Abbildung 9.

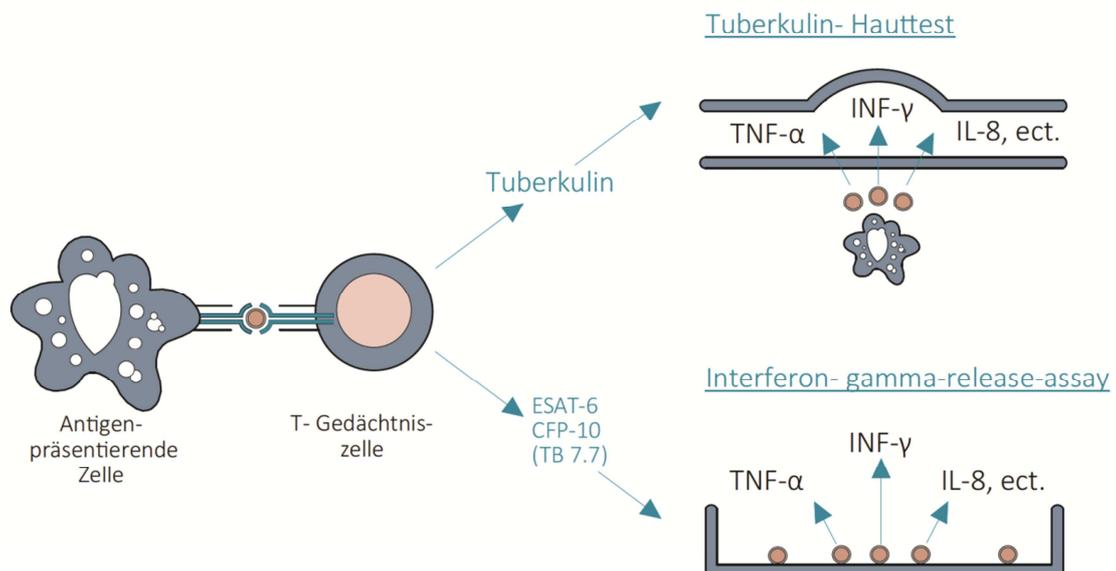


Abbildung 9: Vergleich der Funktionsprinzipien von THT und IGRA (modifiziert nach Pai et al. 2004, 761)

3.5 Einschränkende Faktoren bei Interferon-gamma-Release-Assays

Die Nachteile des IGRAs liegen zunächst darin, dass die Angaben zu Blutentnahme, Transport- und Inkubationsdauer genau eingehalten werden müssen und ein sorgfältiger Arbeitsablauf im Labor unentbehrlich ist (Diel et al. 2011a, 366f.). Weiterhin ist eine Unterscheidung zwischen aktiver und latenter Infektion bei IGRAs problematisch, da das Erinnerungsvermögen der T-Lymphozyten auch noch Jahrzehnte nach der Erstinfektion eine Interferon- γ -Ausschüttung nach Antigenkontakt ermöglicht (Hof 2014, 372). Ein positiver IGRA kann somit eine aktive, therapierelevante Tuberkulose oder eine latente Tuberkulose, eventuell ohne Therapiebedarf, bedeuten. Einschränkungen liegen bei Lymphozytenstimulationstests grundsätzlich dann vor, wenn T-Lymphozyten verändert sind, also z.B. eine Grunderkrankung wie Lymphopenie vorliegt oder eine Immunsuppression besteht (Hof 2014, 372f.).

Speziell für den QFT-GIT gibt der Hersteller folgende Limitationen an (Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 4ff.; 21f.): Es lassen sich allein aus der Höhe der gemessenen Konzentration von Interferon- γ keine Aussagen zu Stadium und Verlauf der Infektion treffen. Zudem sind die Ergebnisse des QFT-GIT kein Maß für die Immunreaktivität des Patienten. Ein positives Ergebnis eines QFT-GIT kann aufgrund der langen Erinnerungsfähigkeit des zellulären Immunsystems sowohl auf eine latente als auch auf eine aktive Tuberkulose hindeuten, daher lässt ein positives Ergebnis eines QFT-GIT keine Rückschlüsse auf Zeitpunkt der Erstinfektion und bisherigen Verlauf der Erkrankung zu. Ein positives Testergebnis des QFT-GIT kann zudem auch durch die Infektion mit anderen Mykobakterienarten wie *M. kansasii* bedingt sein. Zur Diagnose der Erkrankung an Tuberkulose sind daher immer weitere radiologische, mikrobiologische und histologische Untersuchungen von Nöten (Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 4ff.).

4. Datenlage zu Interferon-gamma-Release-Assays

Im Folgenden werden Begriffe definiert, die bei der Auseinandersetzung mit Fragen zur Tuberkulosedagnostik mit IGRAs von besonderer Bedeutung sind.

4.1 Definitionen und Begriffsbestimmungen

Sensitivität

Die Sensitivität ist ein Maß für die Fähigkeit eines Testverfahrens, ein bestimmtes Merkmal zu identifizieren (Ziesing et al. 2012, 147). Die Sensitivität beträgt 100%, wenn das Vorhandensein dieses Merkmals immer ein positives Testergebnis nach sich zieht. Bei Suchtests wie einem IGRA ist eine hohe Sensitivität von großer Bedeutung, um möglichst jeden Merkmalsträger zu erfassen (Ziesing et al. 2012, 147).

Spezifität

Zusätzlich zur Sensitivität ist die Spezifität eines Tests von Bedeutung, da sie ein Maß dafür darstellt, dass das Fehlen eines bestimmten Merkmals erkannt wird (Ziesing et al. 2012, 147). Die Spezifität beträgt 100%, wenn ein Test wie der IGRA bei allen negativen Proben immer das Ergebnis „negativ“ aufweist, also keine falsch-positiven Ergebnisse erbringt. Damit Testergebnisse als verlässlich eingestuft werden können, ist die Kombination aus sowohl hoher Sensitivität als auch hoher Spezifität entscheidend (Ziesing et al. 2012, 147).

Reproduzierbarkeit

In der vorliegenden Studie stellt die Reproduzierbarkeit, synonym Wiederholbarkeit, eines Testvorgangs ein Maß für die Präzision eines Testes dar, wenn dieser unter denselben Laborbedingungen mit derselben Patientenprobe innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls wiederholt wird. Die Definition der Reproduzierbarkeit bezieht sich in dieser Untersuchung auf die Definition des Begriffes „repeatability“, die von der American Society for Testing and Materials festgelegt wurde und die in Studien, die in englischer Sprache verfasst sind, verwendet wird (American Society for Testing and Materials 2009; Metcalfe et al. 2013, 207). In dieser Untersuchung wurde als Modifikation dieser Definition ein möglicher Zeitraum zwischen den Testungen von bis zu einschließlich 28 Tagen festgelegt, da der Hersteller des in dieser Untersuchung verwendeten IGRAs diesen Zeitraum für eine Lagerung der Plasmaproben angibt (Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 14).

Die Untersuchung der Reproduzierbarkeit eines Testverfahrens anhand derselben Patientenprobe kann Aufschluss geben über rein testtypische Eigenschaften und Fehler, da auf diese Weise andere Einflussgrößen wie longitudinale Schwankungen der Immunantwort der Patienten keinen Einfluss auf das Testergebnis haben (Metcalf et al. 2013, 206). In einigen Untersuchungen wird der Begriff der Reproduzierbarkeit auch im Sinne der Reproduzierbarkeit eines IGRA-Testergebnisses anhand einer neuen Patientenprobe nach einer gewissen Zeitspanne, beispielsweise im Rahmen von seriellen Testungen, gebraucht (van Zyl-Smit et al. 2009, 2). Hierbei steht vor allem die Untersuchung der intraindividuellen Variabilität im Fokus.

Interferon- γ -Antwort

Bei dem in dieser Untersuchung verwendeten IGRA wird nach Stimulation von T-Lymphozyten mit spezifischen Antigenen von *M. tuberculosis* die von den T-Lymphozyten sezernierte Menge an Interferon- γ in IU/ml gemessen; von der insgesamt mittels ELISA gemessenen Menge Interferon- γ wird anschließend die Menge an Interferon- γ in IU/ml, die in der Negativkontrolle im Plasma nachgewiesen wurde, subtrahiert (Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 4ff.). Die dadurch errechnete Menge an Interferon- γ in IU/ml entspricht der Menge an Interferon- γ in IU/ml, die nur aufgrund der Stimulation der T-Lymphozyten durch die spezifischen Antigene von *M. tuberculosis* sezerniert wurde (Metcalf et al. 2013, 207). Ein solches quantitatives Messergebnis von Interferon- γ in IU/ml wird in dieser Untersuchung auch als Interferon- γ -Antwort bezeichnet.

Die Bedeutung des Cut-off-Wertes

Als Cut-off-Wert bei IGRAs wird derjenige Wert bezeichnet, der die Grenze zwischen einem negativen und einem positiven Testergebnis markiert. Der vom Hersteller empfohlene Cut-off-Wert des in dieser Untersuchung verwendeten IGRA, der QFT-GIT der Firma Cellestis, a QIAGEN Company, liegt bei 0,35 IU/ml der Interferon- γ -Antwort (Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 21ff.). Nach Analyse von Werten für Sensitivität und Spezifität des QFT-GIT bei Verwendung verschiedener Cut-off-Werte wurde der Wert von 0,35 IU/ml vom Hersteller als der Cut-off-Wert definiert, da dieser Wert mit der optimalen Kombination aus Werten für Sensitivität und Spezifität einhergeht (Vogt 2012, 25). Eine tabellarische Darstellung dieser Analyse ist in Abbildung 10 ersichtlich. Aus dieser Darstellung wird deutlich, dass ein wechselseitiger Zielkonflikt zwischen Sensitivität und Spezifität besteht; erhöht sich ein Wert für Sensitivität oder Spezifität bei Verwendung eines anderen Cut-off-Wertes, so wird gleichzeitig der korrespondierende Wert für Sensitivität beziehungsweise Spezifität erniedrigt (Harada et al. 2008, 351).

Cut-off-Wert (Interferon- γ in IU/ml)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Sensitivität + Spezifität
0.05	98.94	88.13	187.1
0.075	97.87	91.88	189.8
0.10	96.81	93.75	190.6
0.15	94.68	95.00	189.7
0.20	94.68	96.25	190.9
0.25	92.55	96.88	189.4
0.35	92.55	98.75	191.3
0.40	91.49	98.75	190.2
0.45	90.43	99.38	189.8

Abbildung 10: Analyse der Korrelation von Sensitivität und Spezifität in Abhängigkeit des Cut-off-Wertes (modifiziert nach Harada et al. 2008, 351; Vogt 2012, 31)

Konversion und Reversion

Eine Konversion stellt sich dar, wenn, beispielsweise nach Durchführung eines IGRAs, ein zunächst negatives Testergebnis vorliegt und bei erneuter Durchführung eines IGRAs mit einer zu einem späteren Zeitpunkt gewonnenen Blutprobe ein positives Testergebnis bestimmt wird (Pai, O'Brien 2007, 980ff.). Die Konversion wird hervorgerufen durch eine in der Zeit zwischen den Testungen einsetzende Immunreaktion, die einen Anstieg der Werte für die Interferon- γ -Antwort über den Cut-off-Wert in den Positivbereich bedingt (Pai, O'Brien 2007, 980ff.). Es existiert keine einheitliche Definition, ab wann von einer echten Konversion gesprochen werden kann. So ist es bei Konversionen eines IGRAs fraglich, ab welchem Anstieg der Werte für Interferon- γ , also der Werte der Interferon- γ -Antwort, von einer tatsächlichen Neuinfektion ausgegangen werden kann oder aber inwieweit Veränderungen, die durch immunologische Prozesse hervorgerufen werden, für eine Konversion verantwortlich sind (Pai, O'Brien 2007, 980ff.).

Eine Reversion liegt vor, wenn, umgekehrt zur Konversion, ein zunächst positives Testergebnis eines IGRAs bei erneuter Testdurchführung mit einer zu einem späteren Zeitpunkt gewonnenen Blutprobe zu einem negativen Testergebnis wird, bedingt durch einen Abfall der Werte für die Interferon- γ -Antwort unter den Cut-off-Wert in den Negativbereich; Reversionen könnten neben tatsächlicher Elimination der Infektion sowohl durch immunologische Veränderungen seitens des getesteten Individuums als auch durch Variabilität in der Laborroutine hervorgerufen werden (Pai, O'Brien 2007, 981).

Positiver prädiktiver Wert

Der positive prädiktive Wert (PPW) ermöglicht es, eine Aussage darüber zu treffen, ob im Falle eines positiven Testergebnisses das untersuchte Merkmal auch wirklich vorliegt (Ziesing et al. 2012, 147). Im Unterschied zur Sensitivität ist der PPW zusätzlich von der Prävalenz dieses Merkmals in der untersuchten Testpopulation abhängig. Der PPW kann im Gegensatz zur Sensitivität eines Tests abhängig von der jeweiligen Testpopulation variieren (Ziesing et al. 2012, 147). Eine Herleitung des PPW wird in der Formel in Abbildung 11 graphisch dargestellt.

$$\text{PPW} = \frac{\text{Sensitivität} * \text{Prävalenz}}{\text{Sensitivität} * \text{Prävalenz} + (1 - \text{Spezifität}) * (1 - \text{Prävalenz})}$$

Das Diagramm zeigt die Formel für den positiven prädiktiven Wert (PPW). Der Zähler ist 'Sensitivität * Prävalenz', was als 'Testpositive Erkrankte' bezeichnet wird. Der Nenner ist 'Sensitivität * Prävalenz + (1 - Spezifität) * (1 - Prävalenz)', was als 'alle Testpositiven' bezeichnet wird.

Abbildung 11: Positiver prädiktiver Wert (modifiziert nach IBE München, o.J., 10)

Negativer prädiktiver Wert

Der negative prädiktive Wert (NPW) ist wie der PPW von der Prävalenz des untersuchten Merkmals in der untersuchten Testpopulation bestimmt; er dient dazu, eine Aussage darüber zu treffen, ob bei einem negativen Testergebnis das jeweilige Merkmal tatsächlich nicht vorliegt (Ziesing et al. 2012, 147). Die Formel für den NPW lautet wie in Abbildung 12 dargestellt:

$$\text{NPW} = \frac{\text{Spezifität} * (1 - \text{Prävalenz})}{\text{Spezifität} * (1 - \text{Prävalenz}) + (1 - \text{Sensitivität}) * \text{Prävalenz}}$$

Abbildung 12: Negativer prädiktiver Wert (modifiziert nach Hofmann et al. 2014, 13)

4.2 Vergleich von Interferon-gamma-Release-Assays mit dem Tuberkulin-Hauttest

Vor der erfolgreichen Entwicklung von IGRAs war der THT das einzige Testverfahren, das die Detektion von LTBI ermöglichte (Pai et al. 2008, 2). Im Folgenden sollen Studienergebnisse zum Vergleich des THT mit den kommerziell erhältlichen IGRAs vorgestellt werden.

Eine Metaanalyse von Pai et al. mit insgesamt 38 einbezogenen Studien kam im Jahr 2008 zu dem Ergebnis, dass sowohl Quantiferon-Tests als auch der T-SPOT.TB® eine höhere Spezifität als der THT aufweisen (Pai et al. 2008, 1ff.). In den Studien waren neben dem QuantiFERON®-TB Gold In-Tube und dessen Vorgängerversion QuantiFERON®-TB Gold der T-SPOT.TB® und der THT verwendet worden. Zur Bestimmung der Sensitivität wurden mikrobiologisch bestätigte Fälle von Tuberkulose mit den genannten Testverfahren untersucht und zur Bestimmung der Spezifität wurden nur gesunde Probanden ohne Risiko einer *M. tuberculosis*-Infektion mit den genannten Testverfahren untersucht. In der Metaanalyse wurde die Sensitivität des THT nach Analyse von 20 Studien mit 77% (CI 71%-82%) angegeben, die Sensitivität der Quantiferon-Tests nach Analyse von 22 Studien mit 76% (95% CI 72%-80%) und die Sensitivität für den T-SPOT.TB® nach Analyse von 13 Studien mit 90% (CI 86%-93%) beziffert. Die Spezifität des THT war mit 97% (CI 95%-100%) zwar in Populationen mit geringen BCG- Impfraten hoch, jedoch niedrig in Populationen, in denen eine BCG-Impfung häufig ist. Die Spezifität von Quantiferon-Tests lag in dieser Analyse bei 98% (CI 96%-99%), die des T-SPOT.TB® bei 93% (CI 86%-100%) (Pai et al. 2008, 3f.). Diese Untersuchung bescheinigte den IGRAs, insbesondere den Quantiferon-Tests, eine hohe Spezifität, die nicht durch eine etwaige BCG-Impfung beeinflusst war, im Gegensatz zu dem THT, dessen Spezifität nur in Populationen mit niedrigen Impfraten ausreichend hoch war. Der T-SPOT.TB® schien insgesamt eine höhere Sensitivität als die Quantiferon-Tests und der THT aufzuweisen (Pai et al. 2008, 1ff.).

Eine umfangreiche Untersuchung von Diel et al. aus dem Jahr 2009 vergleicht die Leistungsfähigkeit von IGRAs und dem THT bei der Untersuchung von engen Kontaktpersonen von kulturell bestätigten Tuberkulosefällen (Diel et al. 2009, 1010ff.). Bei insgesamt 812 Kontaktpersonen mit positivem THT wurden Tests sowohl mittels QFT-GIT als auch T-SPOT.TB® durchgeführt und ausgewertet. 245 von 812, also 30,2% der Kontaktpersonen wurden positiv mittels QFT-GIT getestet und 233 von 812, also 28,7% der Kontaktpersonen wurden positiv mittels T-SPOT.TB® getestet. Die Übereinstimmung zwischen den beiden IGRAs wurde mit 762 von 812 und somit mit 93,9% als hoch bewertet. Bei Annahme einer tatsächlichen Infektion mit *M. tuberculosis* im Falle von positiven Testergebnissen bei beiden IGRAs, lag die Sensitivität des THT bei einem Cut-off-Wert von 10mm bei 71,5% und die Spezifität des THT bei 64,5%. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass IGRAs einen präziseren Indikator für LTBI darstellen als der THT (Diel et al. 2009, 1010ff.).

Im Jahr 2014 erschien eine systematische Übersichtsarbeit zum Thema des Vergleichs von THT mit IGRAs (De Keyser et al. 2014, 358ff.). De Keyser et al. analysierten neunzehn Studien,

in denen sowohl THT als auch QFT-GIT und/oder T-SPOT.TB® gleichzeitig bei Individuen mit und ohne aktive Tuberkulose durchgeführt worden waren. Die Sensitivität des THT und der IGRAs wurde anhand der Individuen mit bestätigter aktiver Tuberkulose bestimmt, die Spezifität dieser Testverfahren anhand einer Kontrollgruppe, bei der keine Fälle von aktiver Tuberkulose bekannt waren. Die Autoren verglichen in ihrer Metaanalyse sowohl den QFT-GIT mit dem THT als auch den T-SPOT.TB® mit dem THT. Die Sensitivität des QFT-GIT war mit 75% (95% CI 61-86) höher als die des THT mit 64% (48-78), die Spezifität war mit 71% (62-80) für den QFT-GIT sowie mit 70% (95% CI 57-81) für den THT sehr ähnlich. Die Sensitivität des T-SPOT.TB® war mit 90% (95% CI 85-95) wesentlich höher als die des THT mit 64% (46-81). Auch die Spezifität des T-SPOT.TB® war mit 77% (95% CI 68-85) signifikant höher als die des THT mit 57% (41-72). Diese Analyse weist somit ebenfalls daraufhin, dass IGRAs in der Lage sind, eine Infektion mit *M. tuberculosis* präziser zu erkennen als der THT (De Keyser et al. 2014, 358ff.).

4.3 Interferon-gamma-Release-Assays zur Detektion aktiver Tuberkulose

Harada et al. verglichen im Jahr 2008 die Sensitivität und Spezifität zweier IGRAs, den QuantiFERON®-TB Gold (QFT-G) und den QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (QFT-GIT) (Harada et al. 2008, 348ff.). Diese beiden Tests wurden hierzu bei 100 Patienten mit kulturell bestätigter Tuberkulose und bei einer Kontrollgruppe aus 168 Probanden ohne Risiko für eine Infektion mit *M. tuberculosis* durchgeführt. Bei 94 Patienten, bei denen eine Infektion mit *M. tuberculosis* nachgewiesen worden war, waren gültige QFT-GIT-Testergebnisse vorhanden. Von diesen waren 87 mittels QFT-GIT positiv getestet worden, was eine Sensitivität dieses Tests für unbehandelte, aktive Tuberkulose von 92,6% ergab. Eine eindeutig geringere Sensitivität von 81,4% ergab sich für den QFT-G, bei dem 79 von 97 Patienten mit gültigen QFT-G-Testergebnissen und bestätigter *M. tuberculosis*-Infektion positiv ausfielen. Eine Spezifität von 98,8% (CI 95,1% -99,8%) ergab sich für beide Tests. Diese Untersuchung ergab, dass beide Tests hoch spezifisch für eine *M. tuberculosis*-Infektion sind, der QFT-GIT jedoch eine wesentlich höhere Sensitivität als der QFT-G bei der Detektion von aktiver Tuberkulose aufweist (Harada et al. 2008, 348ff.).

Im Jahr 2010 erschien eine Metaanalyse von Diel et al., für die 124 Studien verglichen wurden, die die Sensitivität und Spezifität des QFT-GIT und des T-SPOT.TB® bei bestätigten Tuberkulosefällen untersucht haben (Diel et al. 2010, 952ff.). Zusätzlich wurde in einigen Studien auch der THT angewandt und in die Metaanalyse einbezogen. Die Analyse ergab insgesamt eine Sensitivität von 81% (95% CI 0,78-0,83) für den QFT-GIT und von 88% (95% CI 0,85-0,90) für den T-SPOT.TB®. Die Autoren grenzten hierbei eine Untergruppe ab, die sich nur auf Testdurchführungen in hoch entwickelten Ländern beschränkte. In dieser Untergruppe stieg die Sensitivität für den QFT-GIT auf 84% (95% CI 0,81-0,87) und für den T-SPOT.TB® auf 89% (95% CI 0,86-0,91). Die Spezifität belief sich beim QFT-GIT auf 99% (95% CI 0,98-1,00), da nur vier von 513 getesteten Personen aus der Kontrollgruppe mit dem geringen

Risiko für eine *M. tuberculosis*-Infektion positiv getestet wurden. Der T-SPOT.TB® erreichte dagegen eine vergleichsweise geringe Spezifität von 86% (95% CI 0,81-0,90), was von den Autoren als mögliches Resultat eines Kompromisses im Gegenzug für seine hohe Spezifität gewertet wurde. Für den THT ergab diese Analyse eine Sensitivität für die Detektion der aktiven Tuberkulose von 70% (95% CI 0,67-0,72). Zusammenfassend konnte in dieser Metaanalyse den untersuchten IGRAs, im Vergleich zum THT, eine hohe Leistungsfähigkeit beim Nachweis einer bestätigten aktiven Tuberkulose bescheinigt werden (Diel et al. 2010, 952ff.).

Die systematische Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2011 von Sester et al. befasst sich mit Studien, in denen die Leistung von IGRAs bei aktiver Tuberkulose bewertet wurde (Sester et al. 2011, 100ff.). Nach einer Metaanalyse von 27 Studien wurden für den QFT-GIT und den T-SPOT.TB® für die Diagnose der aktiven Tuberkulose die Sensitivität von 80% (95% CI 75-84%) beziehungsweise 81% (95% CI 78-84%) errechnet. Die Spezifität des QFT-GIT betrug 79% (95% CI 75-82%), die des T-SPOT.TB® 59% (95% CI 56-62%). In dieser Übersichtsarbeit wurden Studien mit Erwachsenen, Personen mit positivem HIV-Status, Personen mit eingeschränkter Immunkompetenz und auch mit Kindern berücksichtigt. Die Autoren resümieren über die Ergebnisse ihrer Arbeit, dass IGRAs nur eingeschränkte Präzision bei der Diagnostik der aktiven Tuberkulose aufweisen. Die geringe Spezifität könne ein Anzeichen sein, wonach IGRAs nur eine ungenaue Aussage darüber treffen können, ob ein Patient an aktiver Tuberkulose erkrankt ist oder eine LTBI vorliegt (Sester et al. 2011, 100ff.).

Unterschiedliche Studienergebnisse zu Sensitivität und Spezifität bei IGRAs zeigen, dass es Einflüsse geben muss, die diese Schwankungen begünstigen. Hang et al. suchten im Jahr 2011 konkret nach Einflussfaktoren, die die Sensitivität von IGRAs bei der Detektion von aktiver Tuberkulose vermindern können (Hang et al. 2011, 1ff.). Hierzu wurden bei 504 Patienten mit kulturell bestätigter aktiver Tuberkulose IGRAs mittels QFT-GIT durchgeführt und die Ergebnisse ausgewertet. Zusätzlich wurden alle Patienten auf eine HIV-Infektion getestet, hierbei stellte sich heraus, dass 8,7% der Patienten HIV-positiv waren. Insgesamt belief sich die errechnete Sensitivität des QFT-GIT auf 92,3% (95% CI 89,6%-94,4%), in der Untergruppe der HIV-positiven sank die Sensitivität auf 61,4% (95% CI 45,5%-75,6%). Weiterhin wurde festgestellt, dass Personen mit einem negativen QFT-GIT-Testergebnis (Durchschnittsalter 48,9 Jahre) wesentlich älter waren als Personen mit einem positiven QFT-GIT-Testergebnis (Durchschnittsalter 39,0 Jahre). Weiterhin wies die Gruppe einen deutlich geringeren Body-Mass-Index von durchschnittlich 16,6 kg/m² auf als diejenigen mit einem positiven QFT-GIT-Testergebnis mit einem durchschnittlichen Body-Mass-Index von 18,3 kg/m². Die Autoren konnten zudem nachweisen, dass das Vorhandensein eines spezifischen Allels für HLA (Human Leukocyte Antigen) dazu führen kann, dass es zu falsch-negativen Ergebnissen eines IGRAs bei aktiver Tuberkulose kommen kann. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Studie darauf schließen, dass neben dem HLA-Genotyp auch Alter, Auszehrung und Koinfektion mit HIV die Sensitivität eines IGRAs bei der Detektion einer aktiver Tuberkulose negativ beeinflussen können (Hang et al. 2011, 1ff.).

4.4 Interferon-gamma-Release-Assays zur Detektion der LTBI

Da kein Goldstandard für die Diagnose einer LTBI anerkannt ist, basieren Studien, in denen diagnostische Mittel zur Detektion von LTBI untersucht werden, meist auf der Einbeziehung des Zusammenhangs von Risikofaktoren, denen die Studienpopulation ausgesetzt war, und den Testergebnissen der Untersuchung (Diel et al. 2009, 1010). Weiterhin wird aufgrund des fehlenden Goldstandards für LTBI die aktive Tuberkulose als Surrogat eingesetzt, auch wenn die Präzision von Sensitivität und Spezifität bei aktiver Tuberkulose möglicherweise nicht zur Gänze auf LTBI übertragbar ist (Pai et al. 2008, 2ff.).

Im Rahmen einer systematischen Übersichtsarbeit von Diel et al. im Jahr 2011 wurden 60 Studien analysiert, die die Genauigkeit zweier IGRAs, des QFT-GIT und des T-SPOT.TB®, und die des THT bei der Diagnose der LTBI untersuchen (Diel et al. 2011b, 88ff.). Diese Studien schlossen teilweise auch HIV-positive Patienten, Personen aus Ländern mit mittleren und hohen Inzidenzen, sowie Kinder ein. Die Metaanalyse befasste sich hierbei insbesondere mit der Spezifität der IGRAs im Vergleich zum THT sowie mit der Evaluation des positiven prädiktiven Werts (PPW) und des negativen prädiktiven Werts (NPW) von IGRAs für die Progression zu aktiver Tuberkulose. Die Spezifität der IGRAs variierte zwischen 98% (95% CI 86,8-99,9%) für den T-SPOT.TB® und 100% (95% CI 97,6-100%) für den QFT-GIT. Die Spezifität des THT erstreckte sich in der Analyse der einbezogenen Studien von 55% (95% CI 38,5-70,7%) bis 95% (95% CI 87,7-97,2%), sodass zusammengefasst eine Spezifität von 88,7% (95% CI 84,6-92%) errechnet werden konnte. Der NPW für die Progression zu aktiver Tuberkulose innerhalb von zwei Jahren in Ländern mit niedrigen Tuberkuloseinzidenzen belief sich für den QFT-GIT auf insgesamt 99,8% (95% CI 99,4-100%) und für den T-SPOT.TB® auf insgesamt 97,8% (95% CI 94,5-99,4%). Die Metaanalyse ergab einen PPW von 2,8-14,3% für den QFT-GIT, einen PPW von 3,3-10% für den T-SPOT.TB® sowie einen PPW von 2,3-3,3% für den THT. Die Autoren kommen anhand dieser Ergebnisse zu den folgenden Schlüssen: IGRAs verfügen im Vergleich mit dem THT über eine höhere Spezifität und sind daher in der Lage, Personen, die nicht mit *M. tuberculosis* infiziert sind, mit größerer Sicherheit zu identifizieren als der THT dies vermag. Zudem sind die prädiktiven Werte für die Progression zu aktiver Tuberkulose bei positiv getesteten Individuen bei IGRAs höher als beim THT. Weiterhin war festzustellen, dass der NPW für IGRAs hoch ist und somit die Fähigkeit von IGRAs, vorherzusagen, ob ein negativ getestetes Individuum tatsächlich nicht an aktiver Tuberkulose erkrankt, groß ist (Diel et al. 2011b, 88ff.).

Der Frage, inwiefern diagnostische Methoden eine Aussage über ein mögliches Fortschreiten einer LTBI hin zu einer aktiven, behandlungsbedürftigen Tuberkulose treffen können, wurde auch in einer weiteren Metaanalyse von Diel et al. aus dem Jahr 2012 nachgegangen (Diel et al. 2012, 63ff.). Als Schlussfolgerung dieser Analyse wurde festgestellt, dass kommerziell erhältliche IGRAs im Vergleich mit dem THT einen höheren PPV und einen höheren NPV für die Progression einer LTBI zu einer aktiven Tuberkulose aufweisen, insbesondere wenn sie an Personen mit hohem Risiko für Tuberkulose durchgeführt werden.

Diese Einschätzung beruht auf folgenden Ergebnissen aus 28 Studien: Der insgesamt errechnete PPW für die Progression einer LTBI zu einer aktiven Tuberkulose betrug für alle berücksichtigten Studien 2,7% (95% CI 2,3%-3,2%) für kommerziell erhältliche IGRAs. Im Vergleich dazu ergab sich für den THT ein PPW für die Progression einer LTBI zu einer aktiven Tuberkulose von 1,5% (95% CI 1,2%-1,7%). Weiterhin konnte bei ausschließlicher Erfassung von Gruppen mit hohem Risiko für Tuberkulose ein Anstieg des PPW auf 6,8% (95% CI 5,6-8,3%) für kommerziell erhältliche IGRAs sowie auf 2,4% (95% CI 1,9%-2,9%) für den THT verzeichnet werden. Der insgesamt bestimmte NPW für die Progression einer LTBI zu einer aktiven Tuberkulose betrug 99,7 % (95% CI 99,5%-99,8%) für die kommerziell erhältlichen IGRAs, beziehungsweise 99,4 % (95% CI 99,2%-99,5%) für den THT (Diel et al. 2012, 63ff.).

Eine Literaturübersichtsarbeit und Metaanalyse von Rangaka et al. aus dem Jahr 2012 untersuchte, ob IGRAs die Entstehung von aktiver Tuberkulose prognostizieren können und ob die Vorhersagekraft von IGRAs derjenigen des THT überlegen ist (Rangaka et al. 2012, 1ff.). 15 Studien wurden in die Untersuchung aufgenommen, die Erwachsene und Kinder, darunter HIV-negative und HIV-positive Personen einschlossen. In diesen Studien waren diagnostische Tests mittels IGRA beziehungsweise THT durchgeführt worden und Verlaufsuntersuchungen fanden nach durchschnittlich vier Jahren statt. Kein Studienteilnehmer war bei Studienbeginn an aktiver Tuberkulose erkrankt. Nach Evaluation ausgewählter Studiendaten konnte ein moderater Zusammenhang zwischen positiven Testergebnissen und nachfolgender Erkrankung an Tuberkulose aufgezeigt werden. Verglichen mit den negativen Testergebnissen, trafen die positiven Testergebnisse von IGRAs und THT eine ähnliche Aussage in Bezug auf das Risiko, an Tuberkulose zu erkranken. So lagen die insgesamt errechneten Werte für das Inzidenzratenverhältnis IRR bei 2,11 (95% CI 1,29-3,46) für IGRAs und bei 1,60 (0,94-2,72) für den THT. Die Ergebnisse konnten dahingehend interpretiert werden, dass weder IGRAs noch der THT eine ausreichend hohe Vorhersagekraft bezüglich der Entstehung aktiver Tuberkulose aufweisen (Rangaka et al. 2012, 1ff.).

4.5 Reproduzierbarkeit von Interferon-gamma-Release-Assays

Fragen zur Reproduzierbarkeit von IGRAs stehen schon seit einigen Jahren im Fokus der Wissenschaft. Im Jahr 2007 wurden Vorschläge für neue Forschungsfelder zu IGRAs von Menzies et al. formuliert (Menzies et al. 2007, 340ff.). Hierbei erschien den Autoren einerseits die Durchführung von Studien zur Reproduzierbarkeit von IGRAs erstrebenswert, die die Testvariabilität anhand wiederholter Testdurchgänge mit denselben Blutproben und entweder demselben oder wechselnden Labortechnikern untersuchen. Andererseits sollten Studien entworfen werden, die mittels Testwiederholungen nach Tagen bis hin zu Jahren an Personen, die keine TB-Expositionsanamnese aufweisen, den Fragestellungen zur immunologischen Variabilität innerhalb des zu testenden Individuums Rechnung tragen. Laut Menzies et al. könnten auf diese Weise gewonnene Informationen dazu beitragen, zufällige

Testvariabilität von echten Konversionen, die durch Neuinfektion entstehen, zu unterscheiden (Menzies et al. 2007, 351f.).

Die Problematik der Definitionsfindung einer Konversion wurde von Pai und O'Brien aufgegriffen (Pai, O'Brien 2007, 980ff.). Die Autoren werfen in diesem Zusammenhang die Frage auf, ob der Cut-off-Wert, der für die Diagnose von LTBI verwendet wird, auch als Cut-off-Wert für die Definition einer Konversion gelten kann. Der Schwellenwert für eine Konversion ist insbesondere bei seriellem Testen, beispielsweise bei regelmäßigen Screening-Untersuchungen auf LTBI bei Beschäftigten im Gesundheitswesen (BiG) von Bedeutung. Bei IGRAs wird hierbei gemeinhin der Wechsel von „negativ“ zu „positiv“ als Schwellenwert für eine Konversion angewandt, diese einfache Definition präzisiert jedoch laut Pai und O'Brien nicht den quantitativen Anstieg über den Ausgangswert des Interferon- γ -Spiegels. Bezüglich der Ergebnisinterpretation von IGRAs im Kontext des seriellen Testens forderten die Autoren ein größeres Augenmerk auf die Abfolge unterschiedlicher Interferon- γ -Werte zu legen als auf die dichotomen Testergebnisse „positiv“ und „negativ“ (Pai, O'Brien 2007, 980ff.).

Eine Pilotstudie von Veerapathran et al. aus dem Jahr 2008 hatte zum Ziel, die kurzzeitige Reproduzierbarkeit des QFT-GIT zu beurteilen (Veerapathran et al. 2008, 1ff.). Dazu wurden 14 Beschäftigte im Gesundheitswesen in Indien innerhalb von 12 Tagen vier Mal in Serie getestet, wobei der QFT-GIT-ELISA bei der gleichen Plasmaprobe jeweils zweimal durchgeführt wurde. Auf diese Weise wurden zwei verschiedene Arten von Reproduzierbarkeit ausgewertet, die Testvariabilität und die personenbezogene Variabilität über einen definierten Zeitraum. Bei der Untersuchung der Testvariabilität konnte eine sehr hohe Konkordanz zwischen den beiden Testdurchführungen an derselben Blutprobe festgestellt werden, da nur die Proben von zwei Individuen keine Übereinstimmung bei dem Wiederholungstest mit derselben Blutprobe aufwiesen. Diskordanz trat dann auf, wenn die gemessene Interferon- γ -Antwort nahe am Cut-off-Wert von 0,35 IU/ml lag, wobei sowohl Anstiege als auch Rückgang der Interferon- γ -Werte verzeichnet wurden, was die Autoren auf die Testvariabilität des QFT-GIT zurückführen. Hierbei fiel auf, dass der zweite Test an derselben Plasmaprobe meist höhere Werte der Interferon- γ -Antwort aufwies als der erste Test. Die Analyse dieser Daten ergab, dass in 95% der Fälle die Interferon- γ -Werte des zweiten Tests derselben Blutprobe um etwa 19% höher waren als beim ersten Test. Die personenbezogene Variabilität während des kontinuierlichen Testens erwies sich in dieser Untersuchung als moderat bis hoch. Personen mit negativen Testergebnissen blieben meist negativ, während positive Testergebnisse sich mit der Zeit tendenziell veränderten. Die evaluierten Daten zeigten, dass Anstiege des Interferon- γ -Spiegels über 16% bei kurzzeitigem seriellen Testen statistisch unwahrscheinlich sind. Die Autoren kommen zu der Hypothese, dass eine echte Konversion eines QFT-GIT zwei Kriterien erfüllen muss. Erstens muss der Wechsel von einem negativen zu einem positiven Testergebnis stattfinden und zweitens muss mindestens ein Anstieg des Interferon- γ von 30% gegenüber dem Ausgangswert der Interferon- γ -Antwort vorliegen (Veerapathran et al. 2008, 1ff.).

Im Jahr 2008 wurde eine Studie publiziert, welche die Reproduzierbarkeit von IGRAs bei Testungen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten untersucht (Perry et al. 2008, 425ff.). In der Ausgangssituation wurde bei 63 Personen, 49 Erwachsene und 14 Kinder, ein QFT-GIT durchgeführt, dieser war bei 15 Personen (24%) positiv. Nach drei Monaten wurden Blutproben dieser Personen erneut mit dem QFT-GIT getestet. Hierbei zeigten sich eine Konversion bei 3 von 48 zunächst negativ Getesteten sowie eine Reversion bei 5 von 15 zunächst positiv Getesteten. Die durchschnittlich nachgewiesene Menge an Interferon- γ betrug 4,99 IU/ml. Bei den acht Personen, die diskordante Testergebnisse aufwiesen, war die höchste Menge an Interferon- γ in beiden Testdurchgängen 0,68 IU/ml. Bei den 10 positiv verbleibenden Personen belief sich die maximal erreichte Interferon- γ -Menge auf 6,59 IU/ml. Aufgrund dieser Daten zur Reproduzierbarkeit von IGRAs schlagen Perry et al. vor, eine „borderline zone“, also einen Grenzbereich, bei der Interpretation der Messergebnisse des QFT-GIT ELISA einzuführen und niedrig-positive Testergebnisse vorsichtig zu beurteilen (Perry et al. 2008, 425ff.).

Harada et al. beschäftigten sich 2008 mit Fragestellungen zum Cut-off-Wert bei IGRAs (Harada et al. 2008, 348ff.). Der vom Hersteller empfohlene Cut-off-Wert von 0,35 IU/ml für den QFT-GIT wurde in der Untersuchung von Harada et al. nach Datenanalyse als angemessen eingestuft, da dieser Wert mit der optimalen Kombination aus Werten für Sensitivität und Spezifität einhergeht (Harada et al. 2008, 348ff.). Dennoch blieb die Auseinandersetzung mit Fragestellungen zur Bedeutung des Cut-off-Wertes auf die Interpretation von IGRA-Messergebnissen weiterhin ein wichtiger Teil des Forschungsfeldes.

Pai et al. widmen sich in einer Studie aus dem Jahr 2009 der Untersuchung eines solchen Grenzbereichs um den Cut-off-Wert (Pai et al. 2009, 1ff.). Hierzu wurden 205 Kontaktpersonen von Tuberkulosefällen wiederholt mit sowohl THT als auch QFT-GIT untersucht. Die erste Testung ergab bei 46% der Getesteten einen positiven THT sowie bei 54% einen positiven QFT-GIT. Von 85 Personen, bei denen sowohl der THT als auch der QFT-GIT zunächst negativ ausgefallen war, konnten für den THT bei der zweiten Testung nach ca. 12 Monaten zwischen 7,5% und 13,8% der Fälle und beim QFT-GIT zwischen 11,8% und 21,2% der Fälle, abhängig von der verwendeten Definition, Konversionen verzeichnet werden. Von den 109 Personen, die zunächst ein positives QFT-GIT-Ergebnis aufwiesen, kam es bei 7 Personen (6,4%) zu Reversionen. Diese traten gehäuft bei Kontaktpersonen auf, deren erster THT negativ war und deren QFT-GIT-Ergebnisse nur wenig über dem Cut-off-Wert lagen. Die Autoren wandten in ihrer Studie zwei Definitionen für die Konversion eines THT an. Die erste Definition bezieht sich auf einen THT-Messwert in der ersten Testrunde von <10 mm und einen THT-Messwert in der zweiten Testrunde von ≥ 10 mm, mit einer Zunahme von 6 mm und die zweite, striktere Definition auf einen THT-Messwert in der ersten Testrunde von <10 mm und einen THT-Messwert in der zweiten Testrunde von ≥ 10 mm, mit einer Zunahme von 10 mm. Unter dieser Definition wurde mit 7,5% die geringste Konversionsrate detektiert. Die Konversion eines QFT-GIT wurde mittels vier verschiedener Definitionen untersucht. Die erste Definition entspricht einem ersten Interferon- γ -Wert von $<0,35$ IU/ml und einem zweiten

Interferon- γ -Wert von $\geq 0,35$ IU/ml, also der Wechsel von negativ zu positiv. Unter dieser Definition wurde mit 21,2% die höchste Konversionsrate detektiert. Die zweite Definition entspricht einem ersten Interferon- γ -Wert von $< 0,35$ IU/ml und einem zweiten Interferon- γ -Wert von $\geq 0,35$ IU/ml mit einem zusätzlichen Anstieg des Interferon- γ von 30% über den Ausgangswert. Die dritte Definition entspricht einem ersten Interferon- γ -Wert von $< 0,35$ IU/ml und einem zweiten Interferon- γ -Wert von $\geq 0,35$ IU/ml mit einem absoluten Anstieg des Interferon- γ von 0,35 IU/ml über den Ausgangswert. Die vierte und strikteste Definition von Konversion entspricht einem ersten Interferon- γ -Wert von $< 0,35$ IU/ml und einem zweiten Interferon- γ -Wert von $\geq 0,70$ IU/ml. Unter dieser Definition wurde mit 11,8% die geringste Konversionsrate detektiert. Die Definition der Reversion für den QFT- GIT entspricht einem ersten Interferon- γ von $\geq 0,35$ Interferon- γ und einem zweiten Interferon- γ -Wert von $< 0,35$ IU/ml. Aufgrund der Tatsache, dass mit der am wenigsten strengen Definition auch die höchsten Konversionsraten einhergingen, vermuten die Autoren, dass ein Teil der hohen Konversionsraten durch Schwankungen um den diagnostischen Cut-off-Wert herum hervorgerufen werden. Sie analysierten daher zusätzlich einen Bereich von 0,20 IU/ml bis 0,50 IU/ml, die „uncertainty zone“, auf beiden Seiten des Cut-off-Werts von 0,35 IU/ml. Interferon- γ -Werte, die sich in diesem Grenzbereich befanden, wurden mit dem Status „unsicher“ deklariert. Werte unter 0,20 IU/ml wurden als „sicher negativ“ und Werte über 0,50 IU/ml als „sicher positiv“ bezeichnet. Eine echte Konversion lag demnach nur vor, wenn der Interferon- γ -Wert der ersten Testung unter 0,20 IU/ml und der der zweiten Testung über 0,50 IU/ml lag. Genauso lag eine echte Reversion nur dann vor, wenn Interferon- γ -Wert der ersten Testung über 0,50 IU/ml und der der zweiten Testung unter 0,20 IU/ml lag. Bei Berücksichtigung des Grenzbereichs sind nur die Hälfte aller Konversionen als echte Konversionen zu verstehen. Die Analyse des Grenzbereichs von Pai et al. ist in Abbildung 13 graphisch dargestellt. Die Autoren schlagen vor, bei Fragestellungen zu Konversionen und Reversionen eher auf den Unterschied der absoluten Interferon- γ -Werte zu achten als auf die rein dichotomen qualitativen Testergebnisse (Pai et al. 2009, 1ff.).

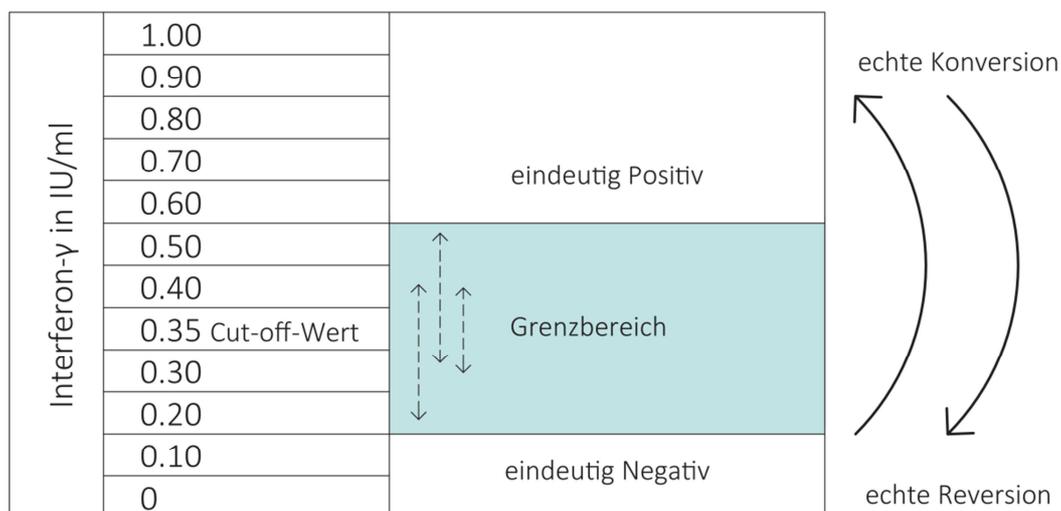


Abbildung 13: Die Analyse des Grenzbereichs um den Cut-off-Wert (modifiziert nach Pai et al. 2009, 10)

Eine weitere Untersuchung aus dem Jahr 2009 befasste sich ebenfalls mit der Reproduzierbarkeit eines IGRAs bei Wiederholungen innerhalb einer kurzen Zeitspanne (Detjen et al. 2009, 1170ff.). Die Autoren gingen dabei auf Fragestellungen sowohl zum seriellen Testen bezüglich der Variabilität von T-Zell-Aktivität innerhalb weniger Tage als auch zur Testvariabilität ein. Zudem untersuchten Detjen et al. mögliche Ursachen von Variabilität wie die Plasmalagerung und den Einfluss unterschiedlicher Anwender auf Testergebnisse. Fragestellungen zur Reproduzierbarkeit in Grenzbereichen wurden hierbei nicht aufgeworfen. Bei 27 Studienteilnehmern wurden je drei QFT-GIT durchgeführt, was nach Duplikationen sechs ELISA-Testpaare pro Proband ergab und insgesamt zu 276 ELISA-Durchgängen führte. Es wurde sowohl frisches als auch bei 4°C für 4 Wochen gelagertes Plasma getestet, wobei sich zeigte, dass diese sachgemäße Lagerung der Plasmaproben keinen signifikanten Einfluss auf die Testergebnisse hat und das bei 4°C gelagertes Plasma in der Laborpraxis genauso gehandhabt werden kann wie frisches Plasma. Der κ -Wert zur Beurteilung der Übereinstimmung der Duplikate anhand der dichotomen Ergebnisse war mit 0,93 hoch, 5 der 138 Testpaare wiesen diskordante Resultate auf. Auch die Durchführung von IGRAs durch verschiedene Anwender bzw. die erneute Durchführung von IGRAs nach drei Tagen ergaben mit 0,82 und 1,00 hohe κ -Werte für die Übereinstimmung. Allerdings zeigte sich erhöhte Variabilität beim Ausmaß der individuellen Interferon- γ -Mengen nach 3 Tagen, die von 0,03 IU/ml bis 11 IU/ml reichten. Dies ließe sich laut Detjen et al. möglicherweise aus Schwankungen der Anzahl von T-Lymphozyten im peripheren Blut erklären und sei bei der Interpretation von IGRA-Testergebnissen bei seriellen Testen von Bedeutung. Die Autoren folgern aus ihren Ergebnissen, dass der QFT-GIT eine hohe Reproduzierbarkeit aufweist und ein zuverlässiges Testverfahren darstellt (Detjen et al. 2009, 1170ff.).

Eine Literaturübersichtsarbeit aus dem Jahr 2009 über die Reproduzierbarkeit von IGRAs, die sich insbesondere mit der personenbezogenen Variabilität von Testergebnissen befasste, zeigte, dass diese intraindividuellen Veränderungen der quantitativen Messergebnisse in der Größenordnung von bis zu 80% auftreten können (van Zyl-Smit et al. 2009, 1ff.). Hierbei lag das Augenmerk auch auf der Bedeutung des Cut-off-Wertes. Van Zyl-Smit et al. verdeutlichen, dass in den untersuchten Studien Variabilität am häufigsten bei zunächst positiven IGRA-Testergebnissen in der Nähe des Cut-off-Wertes auftritt. Dennoch sei es aufgrund der vorhandenen Datenlage bei dem QFT-GIT noch nicht möglich, die „Grauzone“, also den Grenzbereich um den Cut-off-Wert präziser zu definieren. Die Autoren vermuten, dass durch eine genauere Charakterisierung dieses Grenzbereiches klinische Anwender des QFT-GIT größere Sicherheit im Umgang mit Testresultaten nahe dem Cut-off-Wert gewinnen könnten (van Zyl-Smit et al. 2009, 1ff.).

Torres et al. analysierten in ihrer Untersuchung aus dem Jahr 2010 die QFT-GIT-Ergebnisse von 670 Beschäftigten im Gesundheitswesen (BiG), die im Lauf von zwei Jahren zweimal mittels QFT-GIT getestet worden waren (Torres et al. 2010, 461ff.). Bei 48,8% der 41 BiG, die ein zunächst negatives Testergebnis im Intervall zwischen 0,20 IU/ml und 0,35 IU/ml aufwiesen, kam es bei der zweiten Testung zu einem positiven Ergebnis. Dies war im Vergleich

dazu bei nur 4,8% der 376 BiG mit einem zunächst negativen Testergebnis unter 0,10 IU/ml der Fall. Bei 49% der 55 BiG mit einem Ausgangswert von 0,35 IU/ml bis 0,70 IU/ml kam es zur Reversion, dagegen traten bei nur 5,4% der 74 BiG mit Interferon- γ -Werten von über 3,0 IU/ml Reversionen auf. Die Autoren weisen darauf hin, dass eine rein qualitative positiv/negativ-Bewertung der Ergebnisse bei seriellem Testen dazu führen kann, dass spontanen, durch die Nähe zum Cut-off-Wert bedingten Konversionen und Reversionen fälschlicherweise klinische Relevanz zugesprochen wird. Sie schlagen daher vor, bei seriellem Testen die Anwendung eines Grenzbereichs um den Cut-off-Wert einzuführen, um echte Konversion und Reversion präziser zu erkennen. Anhand ihrer Daten definieren die Autoren den vorgeschlagenen Grenzbereich als Intervall zwischen 0,20 IU/ml und 0,70 IU/ml (Torres et al. 2010, 461ff.).

Der Vorschlag einer Einführung eines Grenzbereichs bei dem QFT-GIT im Kontext des seriellen Testens wurde auch von Schablon et al. im Jahr 2010 formuliert (Schablon et al. 2010, 1ff.). In ihrer Studie über das serielle Testen von Beschäftigten im Gesundheitswesen (BiG) mittels IGRA konnten die Autoren nachweisen, dass die Anwendung einer „uncertainty zone“, in diesem Fall ein Grenzbereich von 0,20 IU/ml-0,70 IU/ml in dem keine Testresultate berücksichtigt wurden, bei seriellem Testen von BiG zu niedrigen Konversions- und Reversionsraten von 2,6% beziehungsweise 15,4% führt. Die Anwendung eines solchen Grenzbereichs könnte dazu beitragen, besser zwischen unspezifischen Schwankungen des Tests in der Nähe des Cut-off-Wertes und echten Konversionen und Reversionen unterscheiden zu können. Jedoch empfehlen die Autoren die Anwendung eines solchen Grenzbereichs nur bei seriellem Testen von gesunden Erwachsenen wie BiG in Ländern mit niedriger Tuberkuloseinzidenz. Das Studiendesign basierte ähnlich wie bei Pai et al. 2009 auf der Verwendung vier verschiedener strenger Definitionen von Konversion und Reversion. Die am wenigsten strengen Definitionen führten zu den höchsten Raten für Konversion und Reversion von 6,1% (95% CI 3,5-9,9) und 32,6% (95% CI 19,1-48,5). Die mit 2,5% (95% CI 0,9-5,3) niedrigste Konversionsrate ergab sich bei Anwendung der strengsten Definition für Konversion, die einen Anstieg von über 0,70 IU/ml über den Cut-off-Wert erforderte (Schablon et al. 2010, 1ff.).

Eine weitere Studie zu Variabilität bei seriellem Testen evaluierte die Testergebnisse zweier IGRAs, des QFT-GIT und des T-SPOT.TB® bei Beschäftigten im Gesundheitswesen (BiG) während einer vierwöchigen Testphase (Ringshausen et al. 2011, 1176ff.). In wöchentlichen Abständen wurden 35 BiG wiederholt mit beiden IGRAs getestet. Die evaluierte personenbezogene Variabilität wurde mit $\pm 70\%$ für den QFT-GIT und mit $\pm 60\%$ für den T-SPOT.TB® angegeben. Uneinheitliche Ergebnisse wurden beim QFT-GIT mit vier Konversionen und sechs Reversionen (28,6%) öfter verzeichnet als beim T-SPOT.TB® mit drei Konversionen (8,6%). Die Übereinstimmung beider IGRAs wurde als gut angegeben. Die Autoren führten zudem eine Datenanalyse bezüglich der „borderline zone“, des Grenzbereichs, durch. Das Intervall des Grenzbereichs wurde wie bei Schablon et al. als 0,20 IU/ml-0,70 IU/ml für den QFT-GIT definiert. Die Konversionsrate des QFT-GIT sank nach Berücksichtigung des

Grenzbereichs von 17,4% auf 13,0%. Auch die Reversionsrate des QFT-GIT sank von 50,0% auf 16,7%. Laut Ringshausen et al. rechtfertigen diese Studiendaten die Forderung nach der Verwendung eines Grenzbereichs bei der Interpretation von Testergebnissen bei seriellem Testen. Zudem sollte im Falle eines positiven Ergebnisses im Grenzbereich vor einer präventiven Chemotherapie eine Wiederholungstestung durchgeführt werden (Ringshausen et al. 2011, 1176ff.).

Eine weitere Untersuchung, die sich mit den Fragestellungen von Konversionen und Reversionen bei seriellem Testen befasst, kommt ebenfalls zu dem Schluss, dass es sinnvoll sei, einen Grenzbereich um den Cut-off-Wert zu etablieren (Fong et al. 2012, 55ff.). Dies könnte zu einem Rückgang unnötiger Isoniazid-Therapien führen (Fong et al. 2012, 60).

Eine Studie von Whitworth et al. von 2012 untersuchte den Einfluss unterschiedlicher Laboratorien auf die Variabilität des QFT-GIT (Whitworth et al. 2012, 1ff.). Hierfür wurde den Probanden in einer Sitzung Blut für die Durchführung dreier QFT-GIT in drei unterschiedlichen Laboratorien abgenommen. Die gewonnenen Daten deuten laut Whitworth et al. darauf hin, dass die Variabilität der quantitativen Interferon- γ -Antworten, insbesondere wenn sie sich in der Nähe des Cut-off-Wertes befinden, die Interpretation des QFT-GIT beeinträchtigt. Aus diesem Grund, so die Überlegung der Autoren, sollte bedacht werden, solche Interferon- γ -Werte im Grenzbereich eher als „grenzwertig“ denn als „positiv“ oder „negativ“ zu bezeichnen. Therapieentscheidungen sollten in solchen Fällen überdies individuell und mit Hinblick auf das Infektionsrisiko des Patienten und die Nähe der Interferon- γ -Antwort zum Cut-off-Wert getroffen werden. Die Autoren weisen zudem darauf hin, dass der Mangel an Präzision, den IGRAs bei seriellem Testen und bei Untersuchungen in unterschiedlichen Laboratorien gezeigt haben, auch von Bedeutung ist, wenn es darum geht, individuelle oder initiale IGRA-Testergebnisse zu interpretieren (Whitworth et al. 2012, 1ff.).

Metcalf et al. führten im Jahr 2013 eine Studie durch, deren Fokus auf der Testvariabilität selbst und nicht auf der longitudinalen personenbezogenen Variabilität lag (Metcalf et al. 2013, 206ff.). Diese bisher größte Studie zur Präzision von IGRAs basiert auf der wiederholten Testung derselben Patientenprobe. Auf diese Weise konnte die Präzision eines IGRAs direkt mittels Test-Retest-Verfahren evaluiert werden, ohne dass Veränderungen biologischer Parameter wie Schwankungen der T-Lymphozytenzahl auf die errechnete Variabilität des Tests Einfluss nehmen konnten. Untersucht wurden die Übereinstimmung der qualitativen Testergebnisse zweier Testdurchgänge derselben Plasmaproben sowie die Reproduzierbarkeit quantitativer Interferon- γ -Messergebnisse, zudem wurde ein Schwerpunkt auf die Analyse von Testergebnissen in einem definierten Grenzbereich um den Cut-off-Wert des untersuchten IGRAs (QFT-GIT) gelegt. Als Grenzbereich um den Cut-off-Wert 0,35 IU/ml wurde das Intervall von 0,25 IU/ml-0,80 IU/ml bestimmt. Es wurden Plasmaproben von 543 Personen berücksichtigt. An diesen Plasmaproben wurden wiederholt QFT-GITs durchgeführt, sodass insgesamt 1086 Testresultate zur Analyse zur Verfügung standen. Von 366 Personen war in 28 Fällen (8%) der zweite Test diskordant zum ersten Test.

Von insgesamt 148 zunächst negativen Testergebnissen wurden 13 Proben (9%) beim zweiten Testdurchgang positiv getestet und von 218 zunächst positiven Testergebnissen wurden 15 Proben (7%) beim zweiten Testdurchgang negativ getestet. Die Übereinstimmung zwischen den beiden Testdurchgängen war hoch ($\kappa = 0,84$; 95% CI 0,79-0,90). Die Autoren berichten, dass diskordante Ergebnisse häufiger bei Personen mit ersten Testergebnissen im Grenzbereich auftraten, nämlich in 24 von 28 Fällen (68%) (Metcalf et al. 2013, 206ff.).

Zur Analyse der quantitativen Testergebnisse wurde die zu erwartende Normalverteilung der Interferon- γ -Antwort eines Individuums bei Testwiederholungen derselben Plasmaprobe definiert als Mittelwert der Interferon- γ -Antworten $\pm 1,96$ Standardabweichung (Metcalf et al. 2013, 207). Dieser Bereich um den tatsächlichen, wahren Wert der Interferon- γ -Antwort des Individuums würde theoretisch 95% der durch Wiederholungen des Tests erbrachten Messwerte für dieses Individuum beinhalten (Metcalf et al. 2013, 207; zit. nach American Society for Testing and Materials 2012). Die Analyse ergab bei der zu erwartenden Normalverteilung der Interferon- γ -Antworten bei wiederholtem Testen Differenzen von $\pm 0,60$ IU/ml für alle Individuen (Variationskoeffizient 14%) und für Individuen, deren Interferon- γ -Antwort des ersten Testdurchgangs zwischen 0,25 IU/ml und 0,80 IU/ml lag, Differenzen von $\pm 0,24$ IU/ml (Variationskoeffizient 27%). Die maximale Differenz der Interferon- γ -Antworten zwischen erstem und zweitem Test war bei 14 (4%) von 366 Personen größer als 1,0 IU/ml (Metcalf et al. 2013, 208).

Die Untersuchung von Metcalf et al. kam zu dem Ergebnis, dass allein durch die testtypische Variabilität des QFT-GIT erwartet werden kann, dass erste Testresultate mit einer Interferon- γ -Antwort im untersuchten Grenzbereich bei einer zweiten Testung ein diskordantes Ergebnis aufweisen können (Metcalf et al. 2013, 209). Die Autoren dieser bisher größten Untersuchung der Präzision des QFT-GIT anhand der Reproduzierbarkeit von IGRA-Testergebnissen derselben Plasmaprobe folgern also, dass bei dem QFT-GIT mit beträchtlicher Variabilität der Interferon- γ -Antworten zu rechnen ist, wenn QFT-GITs mit derselben Plasmaprobe wiederholt werden (Metcalf et al. 2013, 206). So kann es laut Metcalf et al. bei Ergebnissen des ersten Tests im Grenzbereich nahe dem Cut-off-Wert von 0,35 IU/ml bei Testwiederholung zu Differenzen von bis zu $\pm 0,24$ IU/ml innerhalb der zu erwartenden Normalverteilung kommen. Daher sollten die Testergebnisse des QFT-GIT, wenn die zugrundeliegende Interferon- γ -Antwort nahe dem diagnostischen Cut-off-Wert liegt, mit Vorsicht interpretiert werden, insbesondere bei Personen mit einem positiven QFT-GIT-Testergebnis mit Interferon- γ -Antwort unter 0,59 IU/ml in Ländern mit niedriger Tuberkulose-Inzidenz. So könnten falsch-positive Testergebnisse und damit auch der eventuell unnötige Einsatz von Chemotherapeutika vermieden werden. Zusammenfassend zeigte sich beim QFT-GIT eine ausgeprägte Variabilität der Interferon- γ -Antworten, wenn eine Plasmaprobe ein zweites Mal getestet wurde. Diese Variabilität charakterisierten die Autoren als typisch für den Test selbst. Auch ließe sich diese Variabilität nicht etwa durch biologische Einflüsse durch das getestete Individuum erklären (Metcalf et al. 2013, 206ff.).

Der testtypische Fehler des QFT-GIT kann laut Metcalfe et al. derart beschrieben werden, dass es in dem Grenzbereich nahe dem Cut-off-Wert bei Wiederholungstestungen zu diskordanten Ergebnissen kommen kann (Metcalfe et al. 2013, 206ff.). Dies sei dadurch erklärbar, dass ein positiver Test mit einer quantitativen Interferon- γ -Antwort in einem Intervall nahe dem Cut-off-Wert bei Wiederholung eine zu erwartende Normalverteilung der Interferon- γ -Werte aufweist, die Werte beinhaltet, die den Cut-off-Wert überschreiten, sodass es bei Testwiederholung zu Diskordanz der Testergebnisse kommt (Metcalfe et al. 2013, 206ff.). Eine graphische Darstellung der bei Testwiederholung zu erwartenden Normalverteilung der Interferon- γ -Werte und seiner Bedeutung bei Interferon- γ -Werten nahe dem Cut-off-Wert ist in Abbildung 14 zu finden.

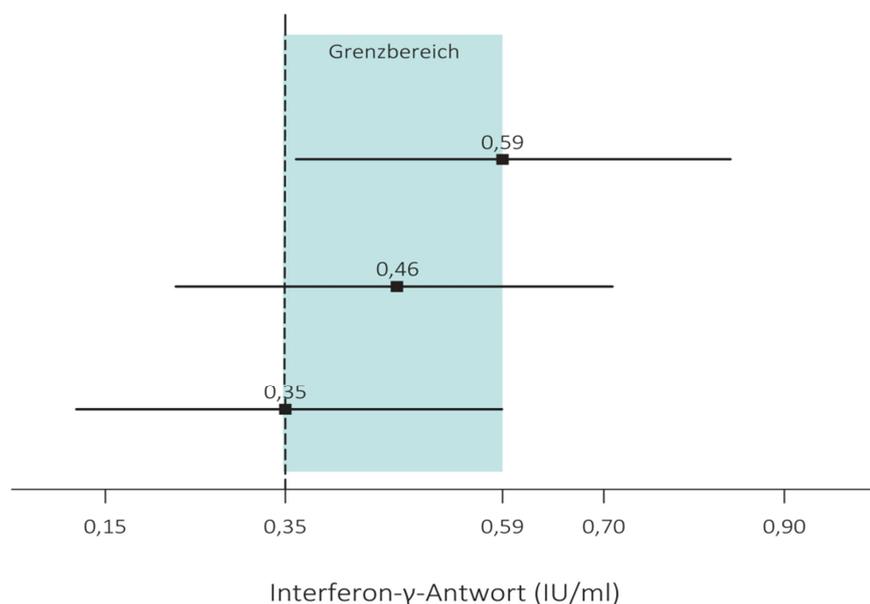


Abbildung 14: Zu erwartende Normalverteilung der Interferon- γ -Werte im Grenzbereich (modifiziert nach Metcalfe et al. 2013, 209)

Die Studienresultate von Metcalfe et al. haben zwar dazu beigetragen, die Bedeutung des Zufallsfehlers bei IGRAs im Grenzbereich von „positiv“ und „negativ“ besser zu verstehen. Dennoch bleibt der Grenzbereich um den Cut-off-Wert ein relativ vages testtheoretisches Konstrukt, zu dem bisher nicht ausreichend konkrete Daten vorliegen. Durch die zunehmende Bedeutung des Einsatzes von IGRAs wie dem QFT-GIT bei Umgebungsuntersuchungen stellt sich also umso dringlicher die Frage, wie präzise sich die Leistung dieses Testverfahrens in der Laborpraxis darstellt. Die Herstellerangaben des QFT-GIT sind dahingehend formuliert, dass keine Wiederholungstestung bei Ergebnissen nahe dem Cut-off-Wert empfohlen wird und valide Testergebnisse, auch wenn diese nahe dem Cut-off-Wert liegen, genauso interpretiert werden wie Ergebnisse, die nicht in einen Grenzbereich um den Cut-off-Wert fallen.

Für das Forschungsfeld sollte es daher von Interesse sein, eventuelle Mängel an Präzision von IGRAs zu detektieren, insbesondere da in der Literatur eine erhöhte Testvariabilität von IGRAs wie den QFT-GIT für quantitative Interferon- γ -Werte nahe dem Cut-off-Wert inzwischen häufig vermutet wird (Pai et al. 2009, 1ff.; van Zyl-Smit et al. 2009, 1ff.).

4.6 Fragestellung und Zielsetzung

Im Zusammenhang mit der Präzision des QFT-GIT stellt sich also die Frage, welche Bedeutung dem Zufallsfehler in Grenzbereichen um den Cut-off-Wert bei der Interpretation von QFT-GIT-Testergebnissen eingeräumt werden sollte. Diese Frage ist deshalb so relevant, da das Resultat „positiv“ oder „negativ“ entscheidend für die weitere Vorgehensweise hinsichtlich der möglichen Therapieoptionen sein kann. Gerade wegen des fehlenden diagnostischen Goldstandards und nicht eindeutiger oder fehlender klinischer Symptomatik, wie es bei LTBI der Fall ist, sind solche Überlegungen von großer Bedeutung.

Als wie zuverlässig ist ein Testergebnis mit einer Interferon- γ -Antwort im Grenzbereich um den Cut-off-Wert zu werten? Wie wahrscheinlich ist es, dass ein Testergebnis mit einer Interferon- γ -Antwort im Grenzbereich bei einer anschließenden zweiten Testung derselben Plasmaprobe auch dasselbe Ergebnis erbringt, also konkordant und damit präzise und reproduzierbar ist? Falls sich abweichende, also diskordante Testergebnisse, ergeben, besteht dann auch eine Korrelation dieser Abweichungen mit der Nähe der gemessenen Interferon- γ -Antwort zum vom Hersteller angegebenen Cut-off-Wert? Sind sowohl Testergebnisse mit Interferon- γ -Antwort im Bereich oberhalb des Cut-off-Wertes, also positive Ergebnisse, als auch mit Interferon- γ -Werten unterhalb des Cut-off-Wertes, also negative Ergebnisse, von etwaigen Diskordanzen betroffen?

Diese Fragestellungen zur Reproduzierbarkeit quantitativer Testergebnisse im Grenzbereich um den Cut-off-Wert konnten in bisherigen Studien noch nicht ausreichend geklärt werden. Die Untersuchung der Reproduzierbarkeit, gemessen an der Wiederholbarkeit des Tests mit derselben Plasmaprobe, hat den Vorteil, von biologischen Parametern wie Schwankungen der T-Lymphozytenzahl im peripheren Blut und von labortechnischen Einflussgrößen wie Unterschieden in der Dauer der Inkubationszeit nicht beeinflusst zu sein und so den mit dem QFT-GIT verbundenen testtypischen Zufallsfehler direkt einschätzen zu können (Metcalf et al. 2013, 206). In der vorliegenden Untersuchung soll anhand von Messungen zur Reproduzierbarkeit von QFT-GIT-Testergebnissen im Grenzbereich versucht werden, die Präzision des QFT-GIT im Grenzbereich mit konkreten Zahlen zu belegen. Eine Erweiterung der Datenlage zu dieser Thematik kann sowohl eine Bereicherung für das Forschungsfeld darstellen als auch klinischen Anwendern größere Sicherheit bei der Interpretation von QFT-GIT-Testergebnissen mit Interferon- γ -Werten nahe dem Cut-off-Wert vermitteln.

Es erschien daher interessant und sinnvoll, das hohe Probenaufkommen in den Laboratorien des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit zu nutzen und aus den Plasmaproben der Routinetestungen diejenigen mit Ergebnissen der Interferon- γ -Antwort, die im relevanten Grenzbereich um den vom Hersteller genannten Cut-off-Wert von 0,35 IU/ml liegen, auszuwählen und ein zweites Mal zu testen, um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit des QFT-GIT in diesem Grenzbereich treffen zu können. Für die vorliegende Untersuchung wurde als Grenzbereich ein Intervall von 0,20 IU/ml bis einschließlich 0,50 IU/ml definiert. Diese Definierung des Grenzbereichs wurde auf der Basis einer früheren Untersuchung von Pai et al. gewählt (Pai et al. 2009, 1ff.). Durch das so definierte Intervall wurde sichergestellt, dass sowohl quantitative Werte unter als auch über dem vom Hersteller genannten Cut-off-Wert von 0,35 IU/ml untersucht werden. Für diese Untersuchung war es nicht nur interessant, ob und wenn ja, wie häufig, sich zunächst positive Testergebnisse mit Interferon- γ -Antworten im Grenzbereich bei Wiederholung des Tests mit derselben Plasmaprobe eventuell diskordant verhalten, sondern auch umgekehrt, ob und wenn ja, wie oft, der Fall eintritt, dass ein vorher negatives Testergebnis mit einer Interferon- γ -Antwort im Grenzbereich bei Wiederholung des Tests mit derselben Plasmaprobe zu einem positiven Testergebnis wird. Diese Untersuchung soll eine Datengrundlage liefern, nach der die Testvariabilität und somit die Präzision des untersuchten IGRAs bei quantitativen Werten der Interferon- γ -Antwort, die in dem definierten Grenzbereich beidseits des vom Hersteller genannten Cut-off-Wertes von 0,35 IU/ml liegen, besser eingeschätzt werden kann. Auf diese Weise können die Studienresultate dieser Untersuchung dazu beitragen, Testergebnisse, deren zugrundeliegende gemessene Interferon- γ -Antwort in dem beschriebenen Grenzbereich liegt, differenzierter zu beurteilen.

5. Material und Methoden

5.1 Auswahl der Proben

Diese Untersuchung basiert auf Daten, die am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit gesammelt wurden. Die Laboratorien des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit erhalten Blutproben von Gesundheitsämtern, Gemeinschaftseinrichtungen für Asylsuchende, Justizvollzugsanstalten sowie von niedergelassenen Ärzten, um die im Infektionsschutzgesetz vorgeschriebenen diagnostischen Untersuchungen auf eine mögliche Tuberkuloseinfektion bei Verdachtsfällen durchzuführen. Gemäß den aktualisierten Empfehlungen des Deutschen Zentralkomitees zur Bekämpfung der Tuberkulose (Diel et al. 2011a, 359ff.) kommt bei Kontaktpersonen von Indexpatienten sowie bei Personen mit Verdacht auf eine LTBI ein IGRA zum Einsatz. Am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit wird hierfür der QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (QFT-GIT) der Firma Cellestis, a QIAGEN Company verwendet.

Für die Untersuchung der Reproduzierbarkeit der quantitativen Messergebnisse des IGRAs in einem definierten Grenzbereich erfolgte zunächst die Auswahl geeigneter, bereits einmal mittels QFT-GIT getesteter Proben aus den Routinetestungen, die in den Laboratorien des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit täglich durchgeführt werden, welche für eine Testwiederholung in Frage kamen. Erfüllten diese Proben die nachfolgend genannten Bedingungen, wurden sie ein zweites Mal mittels QFT-GIT getestet. Die Proben wurden bis zur zweiten Testung bei 2°C bis 8°C bis zu 28 Tage im Kühlraum gelagert. Die Daten beider Testdurchgänge wurden für diese Untersuchung anonymisiert festgehalten. Patientendaten zu Staatsangehörigkeit, Geschlecht, Alter sowie bestehenden Vorerkrankungen oder einer früheren Tuberkuloseinfektion konnten in dieser Studie nicht erhoben werden.

Der Grenzbereich um den vom Hersteller genannten Cut-off-Wert von 0,35 IU/ml wurde vor Beginn der Datensammlung definiert als das Intervall von 0,20 IU/ml bis einschließlich 0,50 IU/ml. Die Auswahl der Proben für eine zweite Testung richtete sich nach folgenden Bedingungen:

- Für Proben im Bereich oberhalb des Cut-offs von 0,35 IU/ml TB-Nil musste im ersten Testdurchgang ein positives Testergebnis von 0,35 IU/ml TB-Nil bis einschließlich 0,50 IU/ml TB-Nil vorliegen.
- Für Proben im Bereich unterhalb des Cut-offs von 0,35 IU/ml TB-Nil musste im ersten Testdurchgang ein negatives Testergebnis von 0,20 IU/ml TB-Nil bis einschließlich 0,34 IU/ml TB-Nil vorliegen.
- „Uneindeutige“ Testresultate im ersten Test wurden unabhängig von den TB-Nil-Werten nicht für eine zweite Testung berücksichtigt.

- Proben, die im Kühlraum länger als 28 Tage zwischen erster und zweiter Testdurchführung gelagert wurden, wurden nicht berücksichtigt, da die Plasmaproben laut Hersteller bei 2 °C bis 8 °C nur bis zu 28 Tage lang gelagert werden dürfen.

Anhand dieser Bedingungen ergab sich eine endgültige Probenanzahl von jeweils 148 Proben in den Bereichen oberhalb sowie unterhalb des vom Hersteller empfohlenen Cut-off-Wertes von 0,35 IU/ml TB-Nil und damit eine Summe von insgesamt 296 Blutproben, an denen eine Wiederholungstestung mit dem QFT-GIT durchgeführt werden konnte. Insgesamt wurden in dieser Untersuchung somit die Ergebniswerte von 592 ELISA-Durchgängen berücksichtigt.

5.2 Materialien

Alle Anwendungen des QFT-GIT erfolgten nach Herstellerangaben (Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 4ff.). Bei der Venenblutentnahme am Patienten wurde je 1ml Blut in die drei verschiedenen Blutentnahmeröhrchen gegeben:

- Negativ-Kontroll-Röhrchen: Kontrolle der Lymphozytenaktivität ohne Antigenstimulation, Hintergrundkorrektur, Korrektur für Effekte eventuell vorhandener heterophiler Antikörper, Korrektur für unspezifisches Interferon- γ
- TB-Antigen-Röhrchen: beschichtet mit den Antigenen ESAT6, CFP-10, TB 7.7
- Mitogen-Röhrchen: Kontrolle der Lymphozytenaktivität nach Antigenstimulation mit Phythämagglutinin A, Positivkontrolle für Interferon- γ

Anschließend wurden die Blutentnahmeröhrchen etikettiert, indem die drei jeweils zu einem Patienten gehörigen Röhrchen mit derselben anonymisierten Identifikationsnummer versehen wurden. So war die korrekte Zuordnung jeder Plasmaprobe mittels Laserscanner im ELISA-Automaten möglich.

Verbrauchsmaterialien

Zur Durchführung eines QFT-GIT mittels ELISA waren laut Hersteller folgende Verbrauchsmaterialien notwendig (Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 7):

- Mikrotiterstreifen mit 12x8 Wells, beschichtet mit murinen monoklonalen Antikörpern gegen humanes Interferon- γ
- Humaner Interferon- γ Standard, lyophilisiert, enthält rekombinant hergestelltes humanes Interferon- γ , Rinder-casein
- Grüne Verdünnungslösung, enthält Rinder-casein und normales Mausserum
- Konjugatkonzentrat, 100-fach konzentriert, lyophilisiert, murines Antikörper-HRP-Konjugat gegen humanes Interferon- γ
- Waschpufferkonzentrat, 20-fach konzentriert, pH 7,2
- Enzymsubstratlösung
- Enzymstopplösung

5.3 Datenerhebung

5.3.1 Durchführung des Interferon-gamma-Release-Assays

Die Innenwand der Röhren weist eine Beschichtung auf, in der sich die Antigene in getrockneter Form befinden. Nach ausreichendem Mischen des Blutes durch vorsichtiges Schütteln wurden die Röhren so schnell wie möglich, aber bis spätestens 16 Stunden nach der Blutentnahme bei 37°C für 16 bis 24 Stunden inkubiert. Die Inkubation konnte dabei bereits am Entnahmeort geschehen und die Proben danach innerhalb von 3 Tagen bei 2°C-27°C an die Laboratorien des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit versandt werden, alternativ konnten die Blutentnahmeröhren innerhalb von 16 Stunden bei 17°C-27°C versandt werden, wobei die Inkubation anschließend in den Laboratorien des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit durchgeführt wurde. Im Anschluss an die Inkubationsphase wurden die Röhren 15 Minuten lang zentrifugiert, sodass sich die Zellen vom Blutplasma trennen und sich am Boden des Röhrchens sammeln.

Vor jeder Testdurchführung wurde zur Qualitätssicherung eine Standardbestimmung mittels einer 1:4-Verdünnungsreihe durchgeführt. Hierfür wurde mit destilliertem Wasser rekonstituierter Kitstandard mit Verdünnungslösung verdünnt und eine Standardkurve von S1 bis S4 hergestellt. Abbildung 15 zeigt eine schematische Darstellung der Herstellung einer Standardkurve.

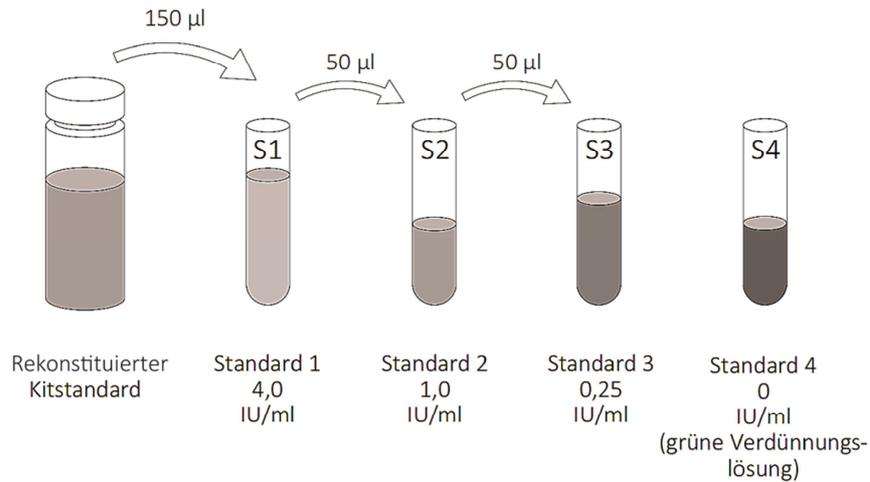


Abbildung 15: Herstellung der Standardkurve (modifiziert nach Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 16)

Zur Durchführung des ELISA zum Nachweis von Interferon- γ wurden Mikrotiterplatten benötigt, deren Vertiefungen (Wells) mit Antikörpern gegen Interferon- γ beschichtet sind. Die Anzahl der für ELISA erforderlichen Wells entspricht der Anzahl der zu testenden Blutentnahmeröhrchen und der Standardverdünnungen. Die folgende Beschreibung bezieht sich auf die Durchführung des ELISA-Verfahrens bei einer Mikrotiterplatte, die mit maximal 88 Proben, also Blutentnahmeröhrchen von 29 Patienten, bestückt werden kann. Zunächst wurde das gebrauchsfertig verdünnte Konjugat hergestellt, indem wiederum der mit destilliertem Wasser rekonstituierte Kitstandard mit Verdünnungslösung verdünnt wurde. Die erforderliche Menge an gebrauchsfertigem Konjugat richtet sich hierbei nach der Anzahl der benötigten Wells. Anschließend wurden mithilfe eines ELISA-Automaten je 50 µl Plasma und Standards in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert. Danach ist eine Inkubationszeit von 120 Minuten bei Raumtemperatur ($22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) erforderlich. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte im Automaten mindestens 6 Mal mit 400 µl Waschpufferlösung pro Well gewaschen. Schließlich wurden 100 µl der Enzymsubstratlösung pro Well zugeben und die Platte wieder 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurden 50 µl Enzymstopplösung in jedes Well pipettiert. Nach Stoppen der Reaktion war es möglich, die optische Dichte jedes Wells mit einem Photometer unter Verwendung eines 450nm-Filters zu messen. Diese Extinktionswerte bildeten anschließend die Grundlage für die Berechnung der Testergebnisse mithilfe der QFT-GIT-Analysesoftware (Cellestis, a QIAGEN Company).

5.3.2 Qualitätskontrolle bei Durchführung des Interferon-gamma-Release-Assays

Die QFT-GIT-Analysesoftware (Cellestis, a QIAGEN Company) berechnete die Standardkurve für jede einzelne Mikrotiterplatte und überprüfte mittels dieser errechneten Standardkurve diejenigen Parameter, die für ein gültiges Testergebnis entscheidend sind. Diese Überprüfung fand dabei vor der Auswertung der eigentlichen Testergebnisse statt. Folgende Kriterien mussten laut Herstellerangaben erfüllt sein, damit die Testergebnisse des ELISA Gültigkeit besaßen, bei Nichtzutreffen eines oder mehrerer der folgenden Kriterien wurde der gesamte Test ungültig und konnte nicht ausgewertet werden (Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 20):

- Der Mittelwert der optischen Dichte (OD) von Standard 1 muss $\geq 0,600$ sein.
- Der prozentuale Variationskoeffizient (%CV) der OD-Werte der Mehrfachbestimmungen von Standard 1 und Standard 2 muss $\leq 15\%$ sein.
- Die OD-Werte der Mehrfachbestimmungen von Standard 3 und Standard 4 dürfen höchstens um 0,040 OD-Einheiten vom jeweiligen Mittelwert abweichen.
- Der aus den mittleren Absorptionswerten der Standards berechnete Korrelationskoeffizient (r) muss $\geq 0,98$ sein.

5.3.3 Interpretation der Ergebnisse des Interferon-gamma-Release-Assays

Die Interpretation der Testergebnisse des QFT-GIT basierte auf den Herstellerangaben (Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 21ff.). Zum Nachweis der Konzentration von Interferon- γ in jedem Well wurden die gemessenen Extinktionswerte von der QFT-GIT-Analysesoftware in Internationale Einheiten pro Milliliter IU/ml umgerechnet. Der Wert für die Konzentration von Interferon- γ des Negativ-Kontroll-Röhrchens wurde vom Wert der Konzentration für Interferon- γ des TB- Antigen-Röhrchens und vom Wert der Konzentration von Interferon- γ des Mitogen-Röhrchens subtrahiert. Der Wert des TB-Antigen-Röhrchens nach Abzug des Wertes der Negativkontrolle wird in dieser Untersuchung auch als „Interferon- γ -Antwort“ bezeichnet.

Die in dieser Untersuchung verwendete QFT-GIT-Analysesoftware (Cellestis, a QIAGEN Company) teilte jeder Identifikationsnummer ein Testergebnis nach dem im Folgenden in Abbildung 16 dargestellten Schema zu.

Negativkontrolle (IU/ml)	TB Antigen minus Negativkontrolle (IU/ml)	Mitogen minus Negativkontrolle (IU/ml)	Ergebnis QFT-Test	Bericht/ Interpretation
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativ	Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> NICHT wahrscheinlich
	≥ 0,35 und < 25% des Negativkontrolle-Werts	≥ 0,5	Negativ	Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> NICHT wahrscheinlich
	≥ 0,35 und ≥ 25% des Negativkontrolle-Werts	beliebig	Positiv	Infektion mit <i>M. tuberculosis</i> wahrscheinlich
	< 0,35	< 0,5	Uneindeutig	Ergebnis uneindeutig hinsichtlich TB- Antigenreaktivität
	≥ 0,35 und < 25% des Negativkontrolle-Werts	< 0,5	Uneindeutig	Ergebnis uneindeutig hinsichtlich TB- Antigenreaktivität
> 8,0	beliebig	beliebig	Uneindeutig	Ergebnis uneindeutig hinsichtlich TB- Antigenreaktivität

Abbildung 16: Interpretation der Ergebnisse des QFT-GIT (modifiziert nach Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 21)

Das in Abbildung 17 dargestellte Flussdiagramm zeigt die Vorgehensweise bei der Interpretation der Testergebnisse:

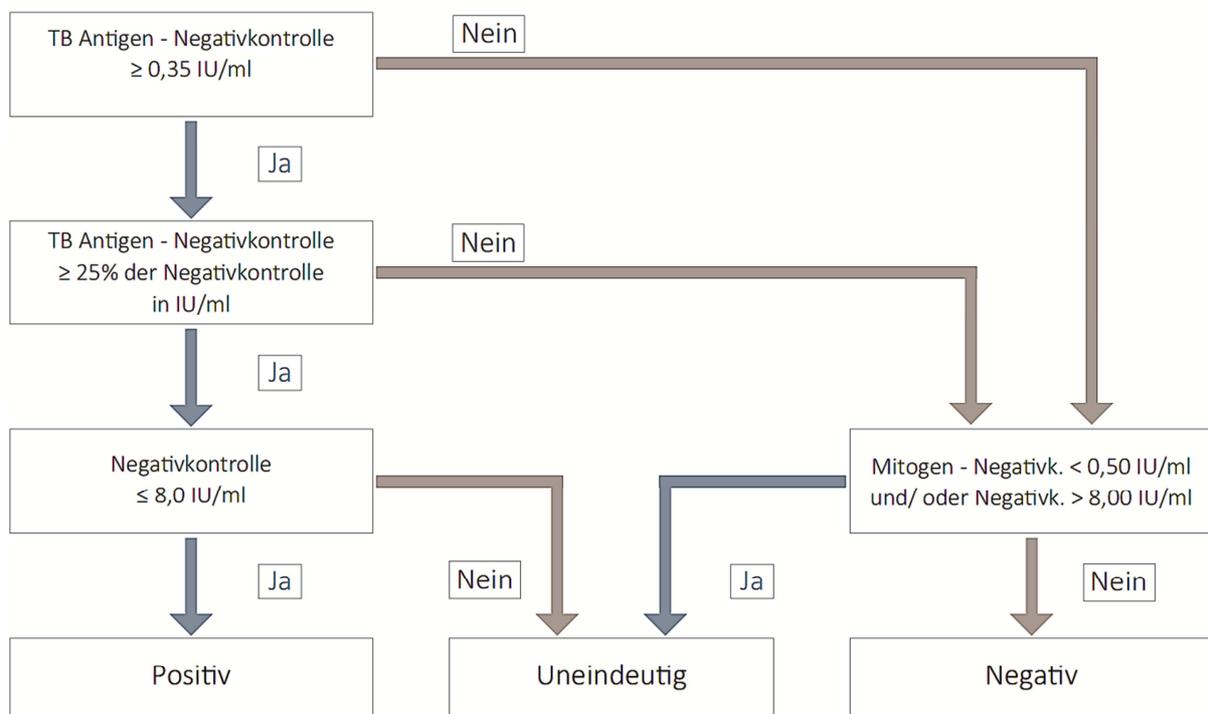


Abbildung 17: Flussdiagramm zur Interpretation der Ergebnisse des QFT-GIT (modifiziert nach Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 22)

Im Folgenden werden die vom Hersteller festgelegten Definitionen der qualitativen Testergebnisse auf der Basis der quantitativen Testergebnisse aufgeführt (Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 21):

Positives Ergebnis

Eine im TB-Antigen-Röhrchen nach Abzug des Wertes für die Negativkontrolle gemessene Konzentration von Interferon- γ von $\geq 0,35$ IU/ml und $\geq 25\%$ des Messwerts der Negativkontrolle ergibt das Ergebnis „positiv“ und eine Infektion mit *M. tuberculosis* gilt als wahrscheinlich. Dabei muss der Wert der Negativkontrolle $\leq 8,0$ IU/ml betragen (Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 21f.).

Negatives Ergebnis

Eine im TB-Antigen-Röhrchen nach Abzug des Wertes für die Negativkontrolle gemessene Konzentration von Interferon- γ von $< 0,35$ IU/ml und ein Wert des Mitogen-Röhrchens nach Abzug des Wertes der Negativkontrolle von $\geq 0,5$ IU/ml oder eine im TB-Antigen-Röhrchen nach Abzug des Wertes für die Negativkontrolle gemessene Konzentration von Interferon- γ von $\geq 0,35$ IU/ml und $< 25\%$ des Messwerts der Negativkontrolle ergibt das Ergebnis „negativ“ und eine Infektion mit *M. tuberculosis* gilt als nicht wahrscheinlich. Dabei muss der Wert der Negativkontrolle $\leq 8,0$ IU/ml betragen (Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 21f.).

Uneindeutiges Ergebnis

Eine im TB-Antigen-Röhrchen nach Abzug des Wertes für die Negativkontrolle gemessene Konzentration von Interferon- γ von $< 0,35$ IU/ml oder eine im TB-Antigen-Röhrchen nach Abzug des Wertes für die Negativkontrolle gemessene Konzentration von Interferon- γ von $\geq 0,35$ IU/ml und $< 25\%$ des Messwerts der Negativkontrolle ergibt das Ergebnis „uneindeutig“, wenn der Wert des Mitogen-Röhrchens nach Abzug des Wertes der Negativkontrolle $< 0,5$ IU/ml beträgt und der Wert der Negativkontrolle $\leq 8,0$ IU/ml. Das Ergebnis „uneindeutig“ ergibt sich außerdem bei einem Wert der Negativkontrolle von $> 8,0$ IU/ml, unabhängig von den Werten des TB-Antigen-Röhrchens und des Mitogen-Röhrchens (Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 21f.).

Eine Kombination von negativer Reaktion auf TB-Antigene und geringer Reaktion auf die Mitogenstimulation kann laut Hersteller folgende Ursachen haben (Cellestis, a QIAGEN Company 2013, 5):

- ungenügende Lymphozytenzahl oder dysfunktionale Lymphozyten in der Blutprobe
- verringerte Lymphozytenaktivität durch unsachgemäßes Befüllen oder Mischen des Mitogen-Röhrchens oder durch unsachgemäße Probenbehandlung wie Nichteinhaltung von Inkubationszeiten, Temperaturvorgaben oder Lagerfristen

5.3.4 Prozedere nach Erhebung der Testergebnisse

Diese Untersuchung stützte sich bei den Testergebnissen des ersten Testdurchgangs auf Daten, die routinemäßig von Mitarbeitern der Laboratorien der Dienststelle des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim im Rahmen der Tuberkulosedagnostik des Öffentlichen Gesundheitsdienstes erhoben wurden. Ausschließlich diese Testergebnisse wurden anschließend den behandelnden Ärzten übermittelt. Die Entscheidung, ob weitere diagnostische Maßnahmen oder eine Therapie einzuleiten seien, oblag den behandelnden Ärzten. Die Testergebnisse der Wiederholungsmessungen, die während dieser Untersuchung am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit anonym erhoben wurden, hatten keinen Einfluss auf eine Therapieentscheidung und dienten nur empirischen Zwecken, um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnisse bei IGRAs im Grenzbereich zu treffen. Hierzu wurden von jedem der 296 Patienten die jeweiligen Werte und Ergebnisse von erstem und zweitem Testdurchgang gegenübergestellt und es wurde eine Datenauswertung anhand statistischer Methoden durchgeführt.

5.4 Methoden zur statistischen Datenauswertung

Die Auswertung der erhobenen Daten wurde mit dem Statistikprogramm Microsoft Excel 2010 durchgeführt. Für jede Patientenprobe wurden folgende Parameter zusammengestellt:

- Das jeweilige Datum von erstem und zweitem Testdurchgang
- Die beiden Werte des Mitogen-Röhrchens nach Abzug der Werte der Negativkontrollen des ersten und zweiten Testdurchgangs
- Die beiden Werte der Negativkontrollen des ersten und zweiten Testdurchgangs
- Die Werte der Interferon- γ -Antwort, also die quantitativen Interferon- γ -Werte des TB-Antigen-Röhrchens nach Abzug der Werte der Negativkontrollen des ersten und zweiten Testdurchgangs
- Die jeweiligen qualitativen Ergebnisse „positiv“ und „negativ“ des ersten und zweiten Testdurchgangs

Aus diesen Parametern wurden für jede Patientenprobe das Wertepaar der quantitativen Interferon- γ -Menge aus erstem und zweitem Testdurchgang sowie die jeweiligen qualitativen Testergebnisse des ersten und zweiten Testdurchgangs gegenübergestellt. Bei der statistischen Datenauswertung kamen für qualitative Analysen Punktwolken und der Cohens-Kappa-Koeffizient sowie für quantitative Analysen ein Bland-Altman-Diagramm zur Anwendung, da diese statistischen Methoden als geeignet gelten für Konkordanzanalysen, wie sie in dieser Untersuchung durchgeführt wurden (Kwiecien et al. 2011, 520; Weiß 2010, 188).

5.4.1 Methoden zur Auswertung qualitativer Daten

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der qualitativen Testergebnisse des QFT-GIT wurde analysiert, in welchen Fällen eine Übereinstimmung der qualitativen Testergebnisse aus erstem und zweitem Durchgang, also Konkordanz, vorlag und in welchen Fällen das Testergebnis des ersten Durchgangs nicht mit dem Testergebnis des zweiten Durchgangs übereinstimmte, also diskordant war. Die Resultate dieser Gegenüberstellung wurden sowohl in absoluter Anzahl als auch prozentual festgehalten. Mittels Vierfeldertafel wurde eine Konkordanzanalyse durchgeführt und der Cohens-Kappa-Koeffizient mit 95% Konfidenzintervall zur Übereinstimmung der qualitativen Testergebnisse von erster und zweiter Testrunde berechnet.

Cohens-Kappa-Koeffizient

Der Cohens-Kappa-Koeffizient (κ) ist ein Maß zur Beurteilung der Übereinstimmungsgüte zweier kategorialer Merkmale (Hamman et al. 2014, 1). Diese Merkmale beziehen sich in dieser Untersuchung auf die qualitativen Testergebnisse „positiv“ und „negativ“. Der relative Anteil der übereinstimmenden Merkmale an der Gesamtanzahl n der Testergebnisse könnte als Maßzahl für die Übereinstimmungsgüte verstanden werden (Grouven et al. 2007, e65). Demnach wäre jedoch auch ein gewisser Grad der Übereinstimmung vorhanden, wenn beide Testdurchgänge rein zufällig dasselbe Ergebnis erbrächten. Um diesen Anteil rein zufällig entstandener Übereinstimmungen aus der Berechnung herausnehmen zu können, wird der Cohens-Kappa-Koeffizient herangezogen (Grouven et al. 2007, e65). Der Cohens-Kappa-Koeffizient berücksichtigt mit p_e diesen Anteil zufälliger Übereinstimmungen. Der Wert p_0 bezeichnet den Anteil tatsächlich beobachteter Übereinstimmungen (Hamman et al. 2014, 1).

$$\kappa = \frac{p_0 - p_e}{1 - p_e}$$

p_0 = Anteil tatsächlich beobachteter Übereinstimmungen

p_e = Anteil zufälliger Übereinstimmungen

Stimmen die Merkmale vollständig überein, so beträgt der Wert des Cohens-Kappa-Koeffizienten 1. Sollten die Übereinstimmungen lediglich der Anzahl der zu erwartenden zufälligen Übereinstimmungen entsprechen, nimmt der Cohens-Kappa-Koeffizient den Wert 0 an.

Zur Interpretation des Cohens-Kappa-Koeffizienten kann die Bewertung aus Abbildung 18 hinzugezogen werden.

Wert von κ	Ausmaß der Übereinstimmung
< 0,20	nicht ausreichend
0,21 - 0,40	hinreichend
0,41 - 0,60	moderat
0,61 - 0,80	gut
0,81 - 1,00	sehr gut

Abbildung 18: Kategorisierung von Cohens-Kappa-Werten (modifiziert nach Altman 1991, 404)

Cohens-Kappa-Koeffizient mit Konfidenzintervall

Mithilfe des Cohens-Kappa-Koeffizienten kann das Maß der Übereinstimmung zweier Testverfahren zwar quantitativ bewertet werden, jedoch kann der Cohens-Kappa-Koeffizient allein keine Aussage über die Zuverlässigkeit dieser Bewertung treffen (Kwiecien et al. 2011, 519). Ein Konfidenzintervall (CI) kann eine Aussage über den Bereich treffen, in dem der tatsächliche Wert, zum Beispiel der Wert des Cohens-Kappa-Koeffizienten, mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit liegt; auf diese Weise können Rückschlüsse über die statistische Plausibilität und die klinische Bedeutung von Untersuchungen gezogen werden. Üblicherweise wird ein Konfidenzintervall von 95% gewählt (du Prel et al. 2009, 1f.). Das Konfidenzintervall für einen Cohens-Kappa-Koeffizienten kann durch folgende Formel beschrieben werden (Kwiecien et al. 2011, 520):

$$CI = \kappa \pm Z_{1-\alpha/2} * \sqrt{\frac{p_0 * (1-p_0)}{n * (1-p_e)^2}}$$

Bei einem 95% Konfidenzintervall ist für das $(1-\alpha/2)$ -Quantil der Standardnormalverteilung $Z_{1-\alpha/2}$ der Wert 1,96 angegeben (Altman et al. 2000, 46).

5.4.2 Methoden zur Auswertung quantitativer Daten

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit der quantitativen Testergebnisse des QFT-GIT wurden zunächst die quantitativen Messungen der beiden Testdurchgänge mithilfe eines Diagramms gegeneinander aufgetragen, sodass eine Punktwolke generiert wurde. Durch diese Punktwolke wurde eine Gerade der Übereinstimmung der quantitativen Messergebnisse gelegt. Wie bei Kwiecien et al. beschrieben, zeigt eine solche Gerade, die Winkelhalbierende, den Grad der Übereinstimmung zwischen den beiden Messwerten (Kwiecien et al. 2011, 516). Stimmen die Messwerte aus Test 1 und Test 2 exakt überein, so liegen sie auf der Geraden der Übereinstimmung. Stimmen die Messwerte aus Test 1 und Test 2 weitgehend überein, so liegen sie in der Nähe der Geraden der Übereinstimmung. Ist eine ausgeprägte Differenz der Messwerte aus Test 1 und Test 2 vorhanden, so kommt es zur Streuung der Punkte ohne sichtbaren Bezug zur Gerade der Übereinstimmung (Kwiecien et al. 2011, 516). Diese zwar anschauliche aber einfache Analysemethode der Korrelation der quantitativen Messungen der beiden Testdurchgänge allein ist nicht ausreichend, um eine Aussage über die Übereinstimmung quantitativer Messergebnisse zu treffen (Kwiecien et al. 2011, 516). Für die differenzierte Analyse quantitativer Messergebnisse wurde in dieser Untersuchung ein Bland-Altman-Diagramm verwendet.

Bland-Altman-Diagramm

Wie von Bland und Altman beschrieben, wurden in dieser Untersuchung die Mittelwerte der Messungen der Interferon- γ -Antworten von Test 1 und Test 2 gegen die Differenzen der Messungen der Interferon- γ -Antworten von Test 1 und Test 2 aufgetragen (Bland, Altman 1986, 308f.). Der Mittelwert aller Differenzen wurde errechnet und als horizontale Linie in das Diagramm eingefügt. Zudem wurden für diese Mittelwertlinie $\pm 1,96$ * Standardabweichung der Differenzen zwei horizontale Linien eingetragen. Diese beiden Linien grenzen einen Bereich der „limits of agreement“ ein, der auch als Übereinstimmungsbereich bezeichnet wird (Kwiecien et al. 2011, 516; Bland, Altman 1986, 308f.). Der Wert 1,96 entspricht dem 97,5%-Quantil der Standardnormalverteilung (Kwiecien et al. 2011, 516f.). Die zu erwartende Normalverteilung bei Testwiederholung besagt, dass etwa 5% der Differenzen aller Messungen außerhalb des Übereinstimmungsbereichs und somit außerhalb der Werte von $\pm 1,96$ * Standardabweichung liegen. Die Differenzen sind bei Normalverteilung also in 95% der Fälle kleiner als der Betrag von „Mittelwert der Differenzen $\pm 1,96$ * Standardabweichung“. Liegt die Mittelwertlinie der Differenzen bei annähernd 0, deutet nichts auf eine systematische Abweichung der Testergebnisse von Test 1 und Test 2 hin. Bland-Altman-Diagramme eignen sich gut, um die Messdifferenzen von Test 1 und Test 2 visuell zu beurteilen (Kwiecien et al. 2011, 516f.).

5.4.3 Methoden zur Datensynthese

Die Synthese der Datenauswertung der qualitativen und quantitativen Testergebnisse des QFT-GIT hat zum Ziel, eine aufschlussreiche Datengrundlage zur Reproduzierbarkeit des QFT-GIT im Grenzbereich zu schaffen. Hierfür wurden sowohl qualitative als auch quantitative Testergebnisse einbezogen. Die Datensynthese beinhaltet die Differenzierung des untersuchten Grenzbereichs um den Cut-off-Wert. Der als Intervall der Interferon- γ -Antwort von 0,20 IU/ml bis einschließlich 0,50 IU/ml definierte Grenzbereich wurde dafür, wie in Abbildung 19 ersichtlich, in sechs Bereiche unterteilt, drei Terzile unterhalb und drei Terzile oberhalb des Cut-off-Wertes, sodass eine weitreichendere Differenzierung der Testergebnisse nach ihrer Nähe zum vom Hersteller angegebenen Cut-off-Wert von 0,35 IU/ml anhand der Werte der Interferon- γ -Antwort des ersten Testdurchgangs möglich war. Sowohl in absoluten Zahlen als auch in prozentualen Anteilen wurde analysiert, wie oft Diskordanz in den jeweiligen Wertebereichen auftrat und inwiefern ein Zusammenhang zwischen diesen Ergebnissen und der Nähe ihrer zugrundeliegenden Interferon- γ -Werte zu dem vom Hersteller angegebenen Cut-off-Wert besteht.

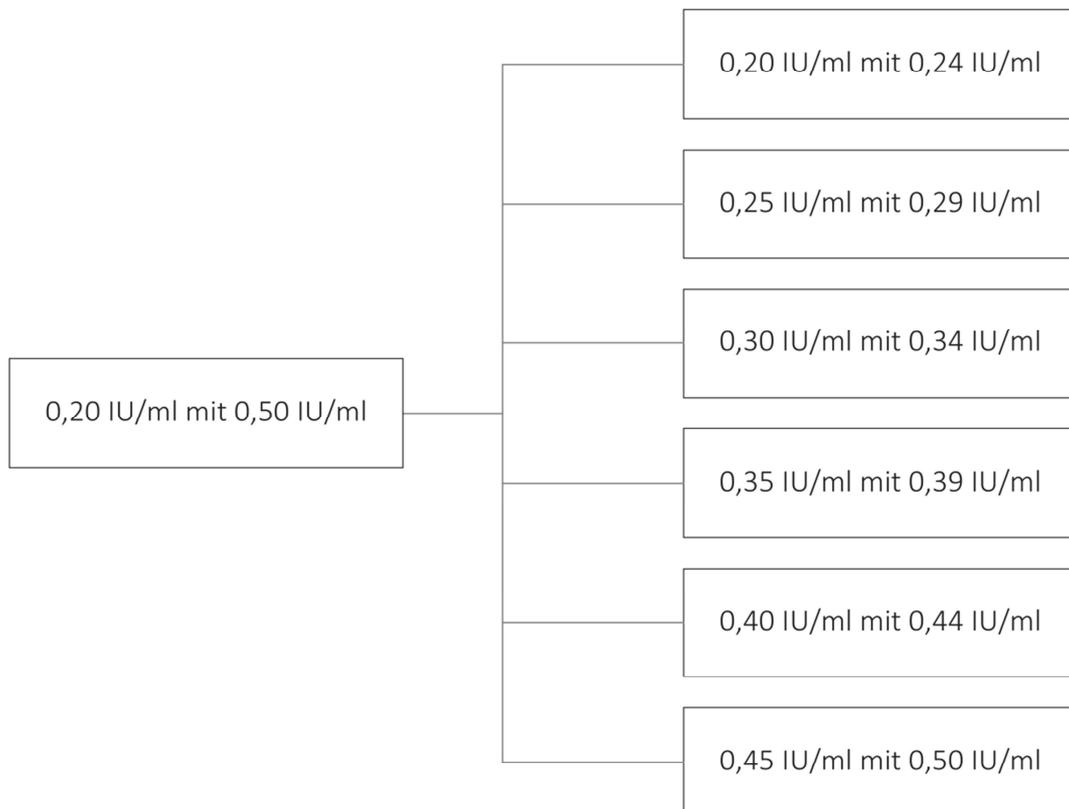


Abbildung 19: Differenzierung des Intervalls der Interferon- γ -Antwort von 0,20 IU/ml bis 0,50 IU/ml

6. Ergebnisse

Für die Untersuchung der Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnisse des QFT-GIT in einem definierten Grenzbereich wurde eine Auswahl geeigneter, bereits einmal mittels QFT-GIT getesteter Proben aus den Routinetestungen, die in den Laboratorien des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit täglich durchgeführt werden, getroffen. Lag die Interferon- γ -Antwort dieser bereits getesteten Proben innerhalb des Intervalls von 0,20 IU/ml bis einschließlich 0,50 IU/ml, wurden sie ein zweites Mal mittels QFT-GIT getestet. Proben, die als erstes Testergebnis „uneindeutig“ aufwiesen sowie Proben, die im Kühlraum länger als 28 Tage zwischen erstem und zweitem Testdurchgang gelagert waren, wurden in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt. Insgesamt ergab sich eine Anzahl n von 296 gültigen Blutproben, davon 148 Proben mit negativen QFT-GIT-Testergebnissen und 148 Proben mit positiven QFT-GIT-Testergebnissen, an denen eine Wiederholungstestung mit dem QFT-GIT-ELISA durchgeführt werden konnte. Das Vorgehen zur Auswahl der Plasmaproben für einen zweiten Testdurchgang ist in Abbildung 20 schematisch dargestellt.

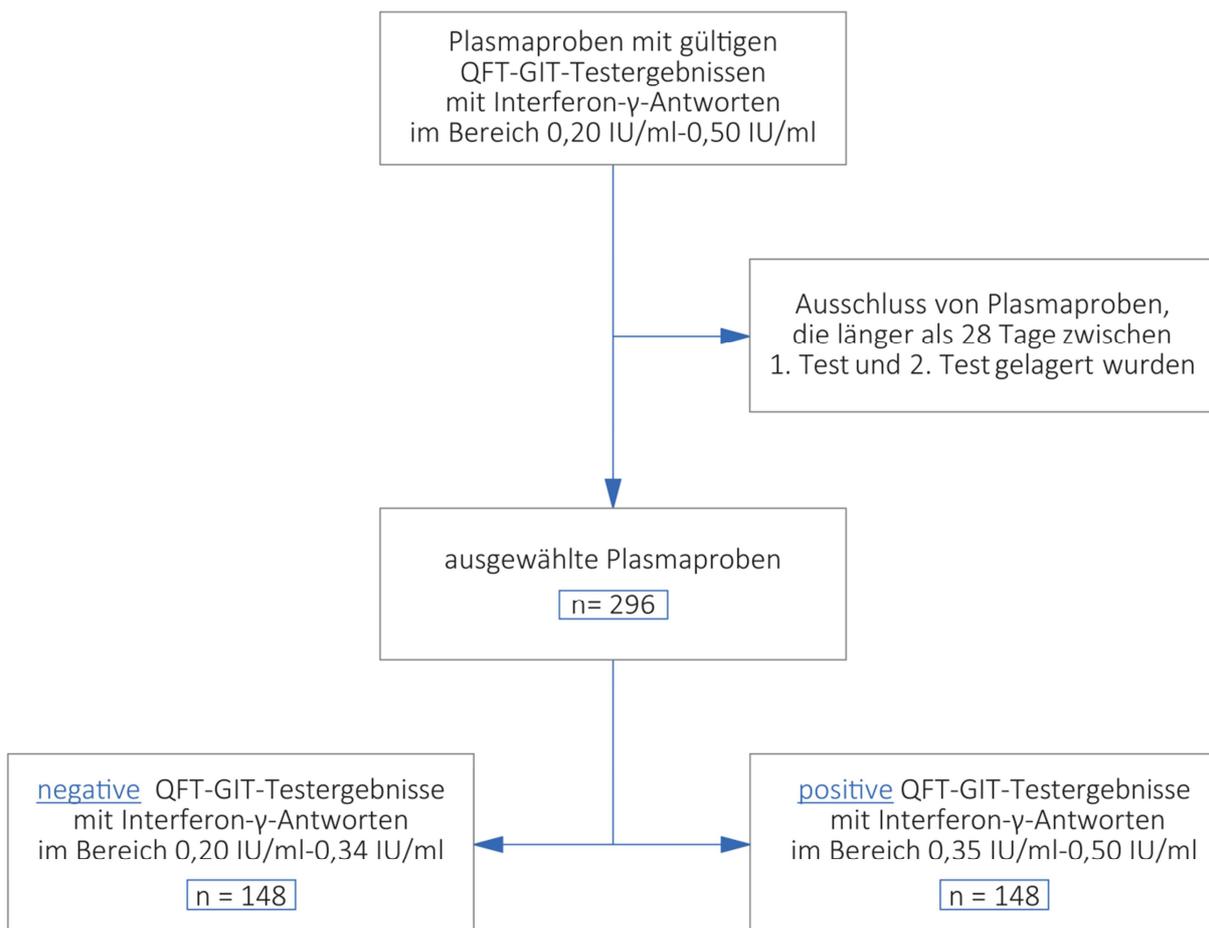


Abbildung 20: Flussdiagramm zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnisse des QFT-GIT im Grenzbereich

6.1 Ergebnisse der Analyse qualitativer Testresultate

Die 296 ausgewählten Plasmaproben wiesen nach dem ersten QFT-GIT-Testdurchgang jeweils 148 positive und 148 negative Testergebnisse auf. Der jeweils zweite an diesen Plasmaproben für diese Untersuchung durchgeführte QFT-GIT ergab 136 positive und 160 negative Testergebnisse sowie 0 uneindeutige Testergebnisse. Mittels Vierfelderanalyse der qualitativen Testergebnisse des ersten und zweiten QFT-GIT-Testdurchgangs wurden Konkordanz und Diskordanz der Testergebnisse festgestellt. Von 148 positiven Testergebnissen des ersten Testdurchgangs wurden im zweiten Testdurchgang 41 (27,7%) negativ, 107 (72,3%) blieben positiv. Von 148 negativen Testergebnissen des ersten Testdurchgangs wurden im zweiten Testdurchgang 29 (19,6%) positiv, 119 (80,4%) blieben negativ. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 21 graphisch dargestellt.

		Test 2		Randsumme
		positiv	negativ	
Test 1	positiv	107	41	148
	negativ	29	119	148
Randsumme		136	160	296

Abbildung 21: Vierfelderanalyse der qualitativen Testergebnisse von Test 1 und Test 2

Wie in den Abbildungen 22 und 23 ersichtlich wiesen insgesamt 226 (76,4%) der 296 Proben im zweiten Testdurchgang ein zum ersten Testdurchgang konkordantes Ergebnis auf und 70 (23,6%) der 296 Proben wiesen im zweiten Testdurchgang ein zum ersten Testdurchgang diskordantes Ergebnis auf.

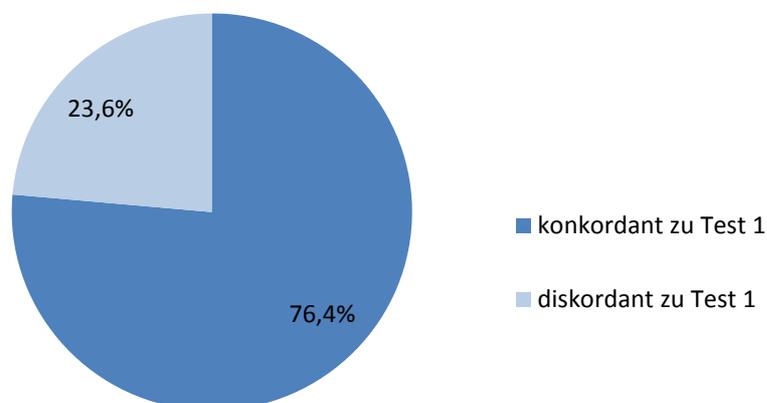


Abbildung 22: Reproduzierbarkeit qualitativer Testergebnisse in Prozent

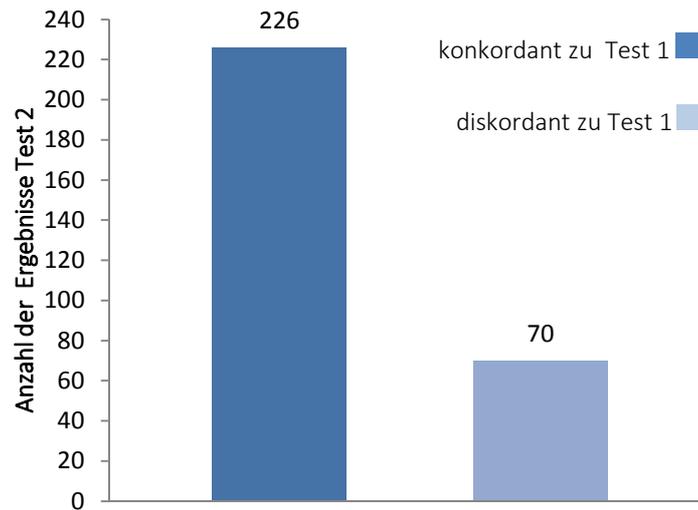


Abbildung 23: Reproduzierbarkeit qualitativer Testergebnisse in Zahlen

Die Übereinstimmung der Resultate des ersten und zweiten QFT-GIT-Testdurchgangs wurde mittels Cohens-Kappa-Koeffizienten beurteilt. Der Cohens-Kappa-Koeffizient beträgt 0,52 (95% Konfidenzintervall 0,43-0,62), was einer moderaten Übereinstimmung der QFT-GIT-Testergebnisse von Test 1 und Test 2 im Grenzbereich um den Cut-off-Wert entspricht.

Im Folgenden wird die für diese Untersuchung durchgeführte Errechnung des Cohens-Kappa-Koeffizienten mit 95% Konfidenzintervall dargestellt:

$$p_0 = \frac{\text{Summe der Übereinstimmungen}}{\text{Gesamtzahl}} = \frac{(107+119)}{296} = 0,763$$

$$p_e = \left[\frac{(107+41)}{296} * \frac{(107+29)}{296} \right] + \left[\frac{(41+119)}{296} * \frac{(29+119)}{296} \right] = 0,5$$

$$K = \frac{p_0 - p_e}{1 - p_e} = \frac{(0,763 - 0,5)}{(1 - 0,5)} = 0,52$$

$$CI = K \pm Z_{1-\alpha/2} * \frac{\sqrt{p_0 * (1-p_0)}}{\sqrt{n * (1-p_e)^2}} = 0,52 \pm 1,96 * \frac{\sqrt{0,763 * (1-0,763)}}{\sqrt{296 * (1-0,5)^2}}$$

95% CI 0,43-0,62

6.2 Ergebnisse der Analyse quantitativer Testresultate

Um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnisse des QFT-GIT im Grenzbereich treffen zu können, wurde zunächst ein Diagramm generiert, in dem die jeweiligen, zu einer Plasmaprobe gehörenden Messergebnisse der Interferon- γ -Antwort in IU/ml von Test 1 und Test 2 gegeneinander aufgetragen wurden, sodass eine Punktwolke entstand. Das Diagramm in Abbildung 24 zeigt die Gerade der Übereinstimmung der Messergebnisse von Test 1 und Test 2. Hierbei wird ersichtlich, dass eine ausgeprägte Streuung der Punkte um die Gerade der Übereinstimmung vorliegt. Dies deutet darauf hin, dass häufig keine Übereinstimmung der zusammengehörigen quantitativen Messwerte von Test 1 und Test 2 auftrat.

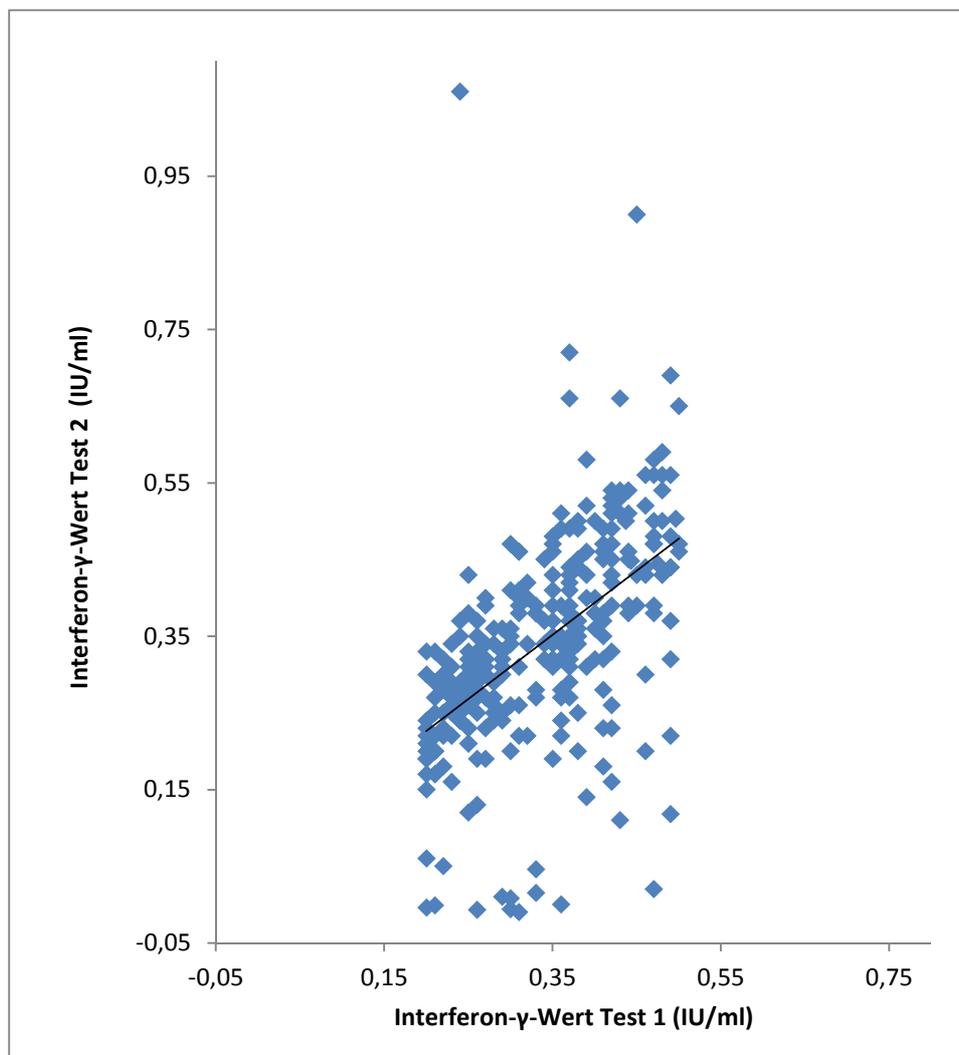


Abbildung 24: Übereinstimmung quantitativer Messergebnisse des QFT-GIT Test 1 versus Test 2

Um die Übereinstimmung der Messergebnisse von Test 1 und Test 2 differenzierter beurteilen zu können, wurde ein Bland-Altman-Diagramm angewandt. Hierfür wurden die Mittelwerte der Messungen der Interferon- γ -Antworten von Test 1 und Test 2 gegen die Differenzen der Messungen der Interferon- γ -Antworten von Test 1 und Test 2 aufgetragen. Der Mittelwert aller Differenzen wurde als horizontale Linie in das Diagramm eingetragen. Diese Mittelwertlinie $\pm 1,96$ * Standardabweichung der Differenzen wurde je als horizontale Linie eingetragen. Diese beiden horizontalen Linien, errechnet aus Mittelwert $\pm 1,96$ * Standardabweichung, grenzen den Übereinstimmungsbereich ein.

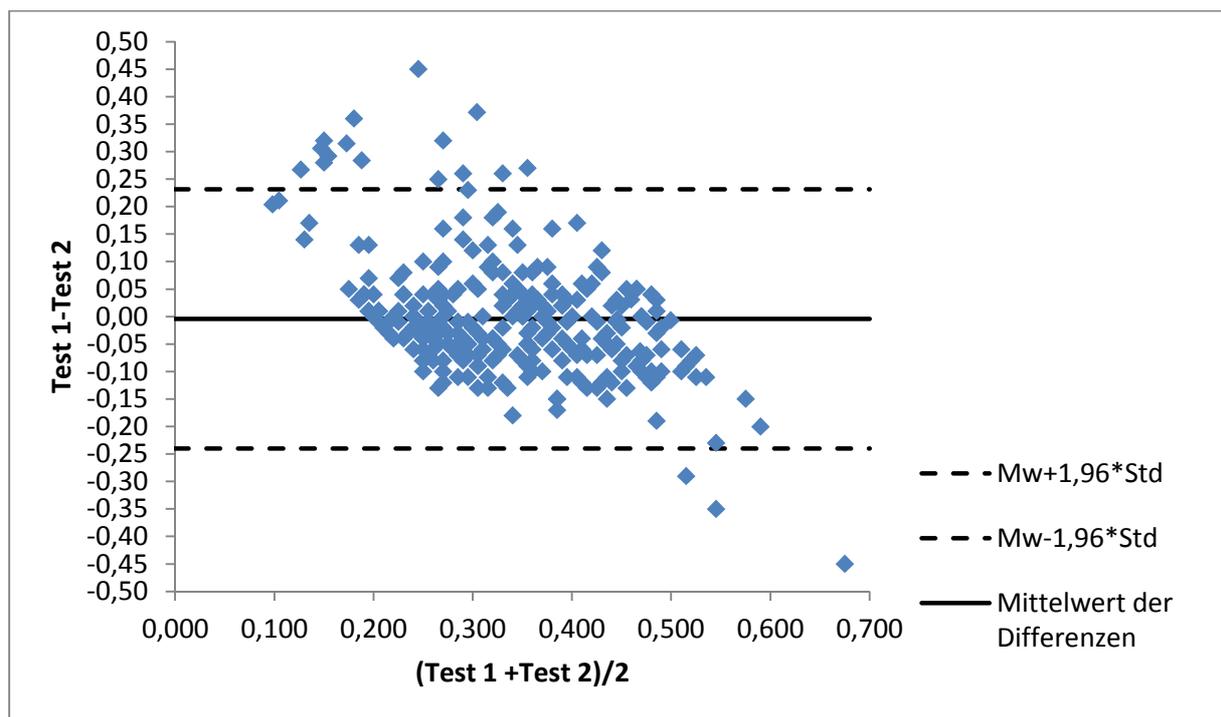


Abbildung 25: Bland-Altman-Diagramm der quantitativen Messergebnisse im Grenzbereich

Abbildung 25 zeigt das Bland-Altman-Diagramm für die Gesamtheit der Messungen. Der Mittelwert der Differenzen nimmt den Wert von annähernd 0,00 IU/ml ein, sodass Abweichungen der Messergebnisse von Test 1 und Test 2 nicht durch einen systematischen Fehler bedingt sein können. Die Standardabweichung der Differenzen beträgt 0,12 IU/ml. Die Größe des Übereinstimmungsbereichs beträgt in beide Richtungen etwa 0,23 IU/ml, wobei die obere Grenzlinie bei 0,23 IU/ml und die untere Grenzlinie bei -0,24 liegt. Bei Annahme der Normalverteilung bedeutet dies, dass in 95% aller Messungen die gemessene Differenz bei Testwiederholung im Bereich des Intervalls von etwa $\pm 0,23$ IU/ml, also innerhalb des Übereinstimmungsbereichs erwartet werden kann. In dieser Untersuchung befanden sich von den insgesamt 296 errechneten Differenzwerten 278 (ca. 94%) im Übereinstimmungsbereich und 18 Differenzwerte (ca. 6%) lagen außerhalb des Übereinstimmungsbereichs. Die höchste Differenz der Messungen von Test 1 und Test 2 lag bei 0,82 IU/ml und somit außerhalb des

Übereinstimmungsbereichs, wobei die Interferon- γ -Antwort von Test 1 in diesem Fall bei 0,24 IU/ml und die von Test 2 bei 1,06 IU/ml lag. Das Bland-Altman-Diagramm macht sichtbar, dass bei Interferon- γ -Antworten im Grenzbereich von 0,20 IU/ml bis 0,50 IU/ml im Mittel zwar eine gute Übereinstimmung der Messergebnisse beider Tests vorherrscht, jedoch zeigt sich anhand des Übereinstimmungsbereichs, dass bei Testwiederholung unter Annahme der Normalverteilung mit Differenzen der Interferon- γ -Antwort von $\pm 0,23$ IU/ml im Grenzbereich gerechnet werden muss.

Der Bereich von $\pm 0,23$ IU/ml um einen wahren Wert der Interferon- γ -Antwort, der bei Testwiederholung unter Annahme der Normalverteilung erwartet werden kann, ist in Abbildung 26 anhand von fünf beispielhaften Interferon- γ -Werten graphisch dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass bei Interferon- γ -Werten im Grenzbereich bei Wiederholung des IGRAs mit derselben Plasmaprobe schon allein durch die Testvariabilität, die durch die erwartete Normalverteilung der Interferon- γ -Werte hervorgerufen wird, häufig mit Überschreitungen des Cut-off-Wertes zu rechnen ist.

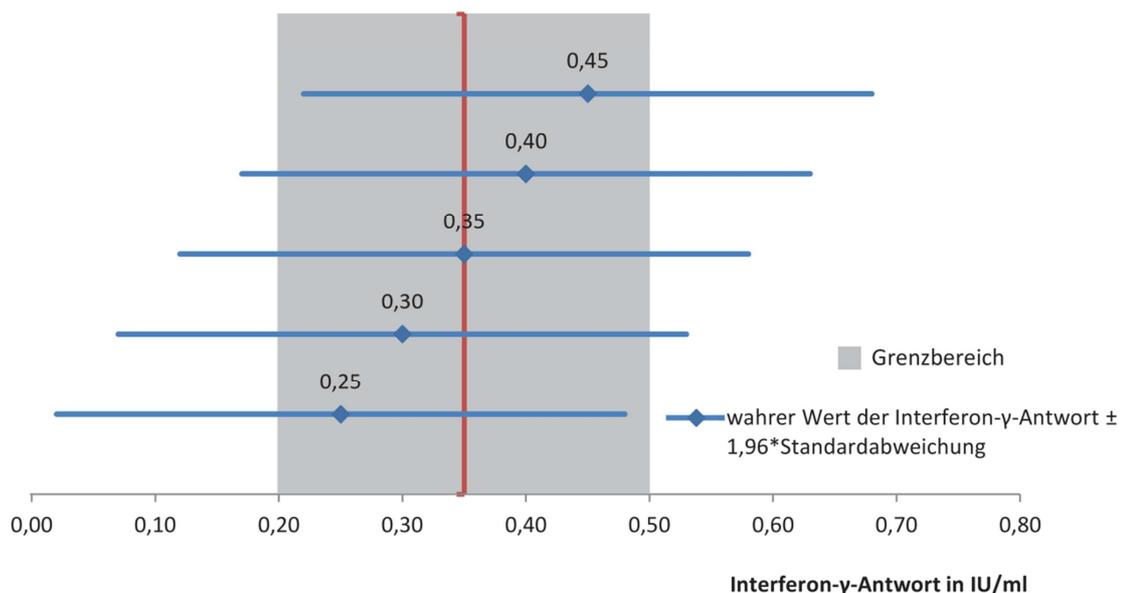


Abbildung 26: Die zu erwartende Normalverteilung von Interferon- γ -Antworten im Grenzbereich

6.3 Synthese qualitativer und quantitativer Ergebnisse

Die Synthese der Studienergebnisse auf der Grundlage der Ergebnisse der Analysen von sowohl quantitativen als auch qualitativen Testresultaten hat zum Ziel, eine aussagekräftige Datenlage zur Reproduzierbarkeit des QFT-GIT zu generieren. Mit der Differenzierung des Grenzbereichs in je drei Intervalle ober- und unterhalb des Cut-off-Wertes von 0,35 IU/ml kann die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse des QFT-GIT im Grenzbereich in Abbildung 27 in Abhängigkeit ihrer quantitativen Interferon- γ -Werte dargestellt werden.

Interferon- γ -Antwort Test 1 in IU/ml	Anzahl n	negativ \rightarrow positiv/ Anzahl n (%)	positiv \rightarrow negativ/ Anzahl n (%)
Gesamt (0,20 - 0,50)	296	29/148 (19,6%)	41/148 (27,7%)
0,20 - 0,24	54	3/54 (5,5%)	-
0,25 - 0,29	59	9/59 (15,3%)	-
0,30 - 0,34	35	17/35 (48,6%)	-
0,35 - 0,39	67	-	25/67 (37,3%)
0,40 - 0,44	44	-	10/44 (22,7%)
0,45 - 0,50	37	-	6/37 (16,2%)

Abbildung 27: Reproduzierbarkeit von QFT-GIT-Testergebnissen in Abhängigkeit der Interferon- γ -Antwort von Test 1

Insgesamt wurden von 148 zunächst negativen Testergebnissen mit Werten der Interferon- γ -Antwort im Bereich von 0,20-0,34 IU/ml 29 (19,6%) beim zweiten Testdurchgang positiv. Für 54 zunächst negative Testergebnisse mit Werten im Bereich 0,20-0,24 IU/ml der Interferon- γ -Antwort wurden 3 (5,5%) positiv. Dieser Anteil diskordanter Ergebnisse erhöhte sich für 59 zunächst negative Testergebnisse mit Werten im Bereich 0,25-0,29 IU/ml der Interferon- γ -Antwort auf 9 (15,3%). Ein weiterer signifikanter Anstieg dieser Diskordanzen wurde mit 17 (48,6%) von 35 zunächst negativen Testergebnissen mit Werten im Cut-off-nahen Bereich 0,30-0,34 IU/ml der Interferon- γ -Antwort festgestellt.

Von insgesamt 148 zunächst positiven Testergebnissen mit Werten der Interferon- γ -Antwort im Bereich von 0,35-0,50 IU/ml wurden 47 (27,7%) beim zweiten Testdurchgang negativ. In dem Bereich 0,35-0,39 IU/ml der Interferon- γ -Antwort, der dem Cut-off-Wert am nächsten liegt, wurden 25 (37,3%) von 67 zunächst positiven Testergebnissen beim zweiten Testdurchgang negativ. Ein Rückgang dieses Anteils an Diskordanzen ist für den Bereich 0,40-0,44 IU/ml der Interferon- γ -Antwort zu verzeichnen, von 44 zunächst positiven Testergebnissen wurden 10 (22,7%) bei dem zweiten Testdurchgang negativ. Diese Tendenz bestätigte sich beim Bereich 0,45-0,50 IU/ml der Interferon- γ -Antwort, also einem Intervall

mit großem Abstand zum Cut-off-Wert. Hier wurden 6 (16,2%) von 37 zunächst positiven Testergebnissen beim zweiten Testdurchgang negativ.

Anhand dieser Synthese qualitativer und quantitativer Ergebnisse wird ersichtlich, dass mit der Nähe zum Cut-off-Wert auch die Häufigkeit diskordanter Ergebnisse zunimmt. Je weiter die Interferon- γ -Antwort des ersten Testdurchgangs vom Cut-off-Wert entfernt lag, desto unwahrscheinlicher wurde das Auftreten eines diskordanten Ergebnisses im zweiten Testdurchgang. Die Reproduzierbarkeit der QFT-GIT-Testergebnisse nimmt mit der Nähe der Interferon- γ -Antwort zum Cut-off-Wert von 0,35 IU/ml deutlich ab.

Anhand der in Abbildung 28 dargestellten prozentualen Verteilung der Häufigkeit des Auftretens diskordanter Testergebnisse lässt sich eine Aussage über die Beziehung von diskordanten Testergebnissen zur Nähe des Cut-off-Wertes treffen. Die vorliegenden Studienresultate zeigen, dass sich qualitative Testergebnisse, die auf einem Wert der Interferon- γ -Antwort von 0,35 IU/ml \pm 0,05 IU/ml basieren, in 48,6% beziehungsweise 37,3% der Fälle bei erneuter Testdurchführung diskordant verhielten. In den Bereichen der Interferon- γ -Antwort von 0,25-0,29 IU/ml und 0,40-0,44 IU/ml, also ab \pm 0,05 IU/ml bis \pm 0,10 IU/ml des Cut-off-Wertes, traten noch immer bei 22,7% beziehungsweise bei 15,3% der Testwiederholungen Diskordanzen auf. Ab \pm 0,11 IU/ml des Cut-off-Wertes wurden Diskordanzen noch bei 5,5% beziehungsweise 16,2% der Testwiederholungen festgestellt.

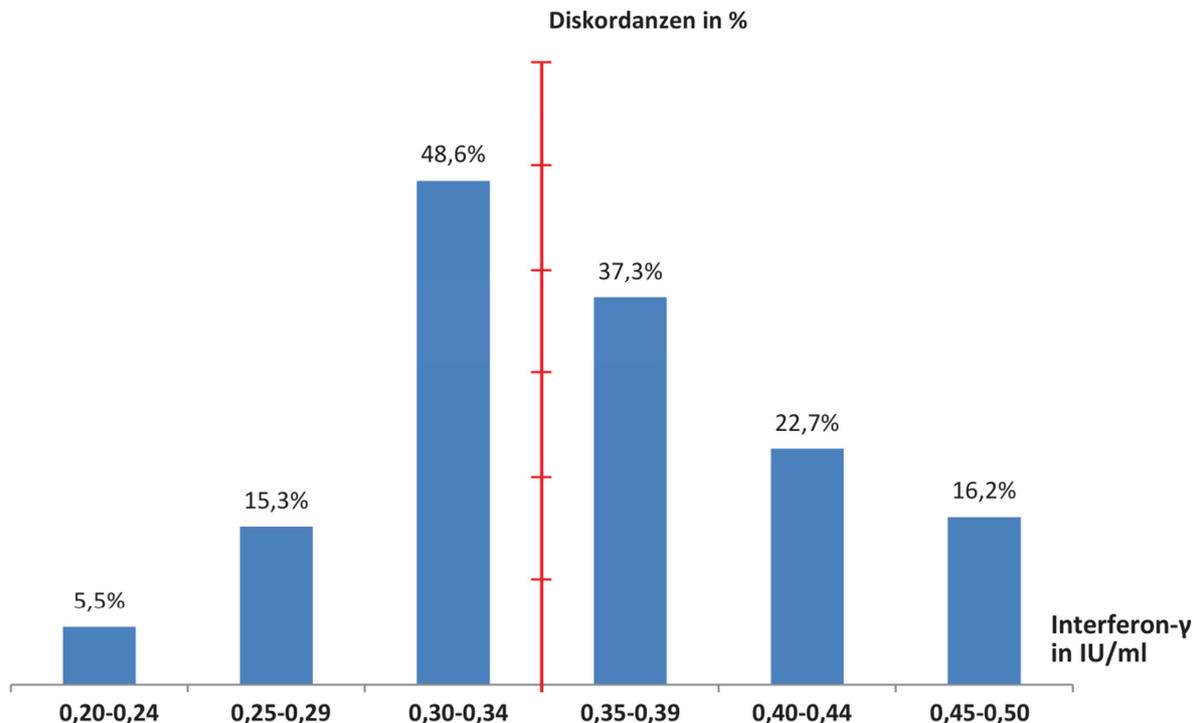


Abbildung 28: Prozentuale Verteilung der Diskordanzen in Abhängigkeit der Interferon- γ -Antworten

7. Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnisse eines IGRAs im Grenzbereich um den Cut-off-Wert. Hierzu wurden bereits getestete Plasmaproben mit quantitativen Messergebnissen im definierten Grenzbereich von 0,20 IU/ml bis 0,50 IU/ml ein zweites Mal getestet. Anschließend wurden die Werte der ersten Testdurchführung mit denen der zweiten Testdurchführung verglichen. Die Analyse der gewonnenen Daten weist auf eine ausgeprägte Testvariabilität des IGRAs hin, insbesondere bei quantitativen Messergebnissen in unmittelbarer Nähe des Cut-off-Werts. Die Ergebnisse dieser Untersuchung liefern wichtige Erkenntnisse für die Interpretation von IGRA-Testergebnissen mit quantitativen Messwerten im Grenzbereich.

IGRAs haben sich zu einem weitverbreiteten und gängigen Testverfahren zur Detektion der Infektion mit *M. tuberculosis* entwickelt. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass für IGRAs höhere Werte für Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden konnten als für den THT (Diel et al. 2009, 1010ff.; De Keyser et al. 2014, 358ff.). In der Literatur wird jedoch häufig berichtet, dass die Präzision von IGRAs, also die Reproduzierbarkeit von Testergebnissen bei erneutem Testen, deutlichen Schwankungen unterworfen ist (Veerapathran et al. 2008, 1ff.; Pai et al. 2009, 1ff.; Detjen et al. 2009, 1170ff.). Zahlreiche Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit von IGRA-Testergebnissen über einen längeren Zeitraum von Tagen bis Jahren, etwa bei seriellem Testen, zeigen eine deutliche Variabilität der Interferon- γ -Antwort, die zum Auftreten von Konversionen und Reversionen führte. Hierbei hat sich herauskristallisiert, dass bei QFT-GIT-Testergebnissen, insbesondere wenn deren Interferon- γ -Werte im Grenzbereich um den Cut-off-Wert liegen, ausgeprägte Variabilität auftreten kann (Veerapathran et al. 2008, 1ff.; Pai et al. 2009, 1ff.; Detjen et al. 2009, 1170ff.). Es wurden Forderungen laut, diesen Grenzbereich näher zu definieren und die Datenlage zur Präzision von IGRAs im Grenzbereich zu verbessern (Perry et al. 2008, 425ff.; Torres et al. 2010, 461ff.; Schablon et al. 2010, 1ff.). Manche Fragen zur Variabilität von IGRAs konnten noch nicht vollständig beantwortet werden, etwa ab welchem Ausmaß an Veränderung der Interferon- γ -Antwort von echter Konversion beziehungsweise Reversion, also einer tatsächlichen Änderung der Immunantwort des Patienten, ausgegangen werden kann (Detjen et al. 2009, 1174).

Die Testvariabilität des QFT-GIT wurde bisher in nur wenigen Untersuchungen thematisiert (Detjen et al. 2009; Metcalfe et al. 2013, 206ff.). Es handelt sich hierbei um die Eigenschaft des QFT-GIT, durch zufällige, unspezifische und unvermeidliche Schwankungen der Interferon- γ -Antwort bei Wiederholung des Tests unterschiedliche Ergebniswerte zu produzieren. Diese Form der Variabilität ist typisch für den QFT-GIT und kann bei Wiederholung des Tests mit derselben Plasmaprobe beobachtet werden. Metcalfe et al. haben gezeigt, dass die Testvariabilität ein Grund sein kann, weshalb IGRA-Testergebnisse im Grenzbereich nur begrenzt reproduzierbar sind (Metcalfe et al. 2013, 206ff.).

Die Autoren wiesen nach, dass bei Testwiederholung die zu erwartende Normalverteilung der Messergebnisse im Grenzbereich um den tatsächlichen, wahren Wert Differenzen von bis zu $\pm 0,24$ IU/ml beinhalten kann (Metcalf et al. 2013, 206ff.). Dies führt bei Interferon- γ -Werten nahe dem Cut-off-Wert häufig zu Diskordanzen der Testergebnisse.

Im Vorfeld der Datenerhebung für die vorliegende Arbeit ist das Vorhandensein der Testvariabilität des IGRAs zwar vorausgesetzt worden, jedoch war unklar, von welchem Ausmaß der Testvariabilität im Grenzbereich auszugehen ist und welchen Einfluss dieses Ausmaß der Testvariabilität auf die Reproduzierbarkeit des IGRAs hat. Da die vorliegende Untersuchung das Ziel verfolgt, eine Datengrundlage über die Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnissen im Grenzbereich zu schaffen, wurde, wie im Jahr 2013 bei Metcalfe et al. (Metcalf et al. 2013, 206ff.), das Test-Retest-Verfahren, also das zweimalige Testen derselben Plasmaprobe, angewandt. So konnte das Ausmaß der Testvariabilität und damit der Einfluss der Fehlerquelle, die für unspezifische Schwankungen der Interferon- γ -Antworten im Grenzbereich verantwortlich ist, evaluiert werden. Bei Verwendung derselben Plasmaprobe zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit kann davon ausgegangen werden, dass immunologische Variabilität, wie Schwankungen in der T-Lymphozytenzahl über die Zeit, keine Rolle spielt und so tatsächlich eine Datengrundlage zur Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnisse von IGRAs in Grenzbereichen basierend auf dem Einfluss der Testvariabilität generiert wird.

Zur Auswertung der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung wurden die Daten aus erstem und zweitem Testdurchgang einander gegenübergestellt und mithilfe statistischer Methoden analysiert. Um die Größenordnung der angenommenen Testvariabilität zu evaluieren und so den Einfluss des testtypischen Fehlers auf IGRA-Testergebnisse mit Interferon- γ -Werten im Grenzbereich bewerten zu können, wurde zunächst anhand des Mittelwerts der Differenzen der Interferon- γ -Antworten $\pm 1,96$ * Standardabweichung die bei Testwiederholung zu erwartende Normalverteilung der Interferon- γ -Antworten eines Individuums im Grenzbereich ermittelt. Die Normalverteilung bei Testwiederholung konnte über die Ausdehnung des Übereinstimmungsbereichs im Bland-Altman-Diagramm graphisch dargestellt werden und beinhaltet für Interferon- γ -Werte im Grenzbereich Differenzen von bis zu $\pm 0,23$ IU/ml der gemittelten Interferon- γ -Antwort. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Testvariabilität des QFT-GIT bei Testwiederholung auf der zu erwartenden Normalverteilung im Grenzbereich basiert und verdeutlichen, weshalb Diskordanzen in der Nähe des Cut-off-Wertes gehäuft auftreten. Tatsächlich verhielten sich die im Grenzbereich liegenden Testergebnisse von 296 Plasmaproben bei erneuter Testung in 70 Fällen diskordant, das entspricht einem deutlichen Anteil von 23,6%. In der vorliegenden Arbeit lagen die Differenzwerte der Messungen, gemäß der zu erwartenden Normalverteilung bei Testwiederholung, in 278 von 296 Fällen, und damit in annähernd 95% der Fälle, im Bereich von $\pm 0,23$ IU/ml. Der Mittelwert von 0,00 IU/ml der Differenzen der quantitativen Messergebnisse von erstem und zweitem Testdurchgang zeigt, dass keine systematische Abweichung der beiden Messergebnisse von erstem und zweitem Testdurchgang vorlag. Dies kann dadurch begründet sein, dass die Standardisierung der

Laborabläufe und die Einhaltung der Herstellerangaben zur Minimierung der systematischen Variabilität beitragen. Um die Übereinstimmung der Testergebnisse des ersten und zweiten QFT-GIT-Testdurchgangs statistisch zu beurteilen, wurde der Cohens-Kappa-Koeffizient κ errechnet. Der Wert von κ beträgt 0,52 (95% CI 0,43-0,62). Dies entspricht einer nur moderaten Übereinstimmung der QFT-GIT-Testergebnisse aus erstem und zweitem Testdurchgang bei quantitativen Messergebnissen des ersten QFT-GIT im Grenzbereich. Der Zusammenhang von Diskordanz und Nähe der Interferon- γ -Antwort zum Cut-off-Wert von 0,35 IU/ml wurde durch die Differenzierung des Grenzbereichs in je drei Terzile oberhalb und unterhalb des Cut-off-Wertes veranschaulicht. Hierbei wird deutlich, dass das Auftreten von Diskordanzen mit der Nähe der zugrundeliegenden Interferon- γ -Antwort des ersten Testdurchgangs zum Cut-off-Wert in Korrelation steht. Dies ist sowohl bei zunächst negativen als auch bei zunächst positiven Testergebnissen der Fall. In den beiden Terzilen, die dem Cut-off-Wert am nächsten liegen, wurden mit 48,6% für den Bereich 0,30 IU/ml bis 0,34 IU/ml und mit 37,3% für den Bereich 0,35 IU/ml bis 0,39 IU/ml die höchsten Anteile an diskordanten Testergebnissen festgestellt. Der Anteil an diskordanten Testergebnissen nimmt mit zunehmender Distanz zum Cut-off-Wert kontinuierlich ab. Dieser Zusammenhang spiegelt die Erkenntnisse aus der bei Testwiederholung zu erwartenden Normalverteilung der Interferon- γ -Antwort im Grenzbereich wider und zeigt, dass die Testvariabilität insbesondere nahe dem Cut-off-Wert stark ausgeprägt ist.

Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen dieser Untersuchung schließen, dass die Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnisse des QFT-GIT im Grenzbereich mit der Nähe zum vom Hersteller angegebenen Cut-off-Wert von 0,35 IU/ml abnimmt, dass die Übereinstimmung von erstem und zweitem Testergebnis nur mäßig stark ausgeprägt ist, wenn die Interferon- γ -Werte des ersten Tests im Grenzbereich liegen, und dass aufgrund der zu erwartenden Normalverteilung bei Testwiederholung mit möglichen Differenzen der Interferon- γ -Antwort von bis zu 0,23 IU/ml gerechnet werden muss und daher bei IGRA-Testergebnissen im Grenzbereich hohe Diskordanzraten von bis zu 48,6% nahe des Cut-off-Wertes auftreten können. Die Ergebnisse dieser Untersuchung legen nahe, IGRA-Testergebnisse mit quantitativen Werten der Interferon- γ -Antwort im Grenzbereich von 0,20 IU/ml bis einschließlich 0,50 IU/ml mit Vorsicht zu beurteilen, da durch die Testvariabilität des IGRAs mit einer erhöhten Ungenauigkeit im Grenzbereich zu rechnen ist.

Ein Vergleich der vorliegenden Untersuchung mit entsprechenden Arbeiten anderer Autoren zeigt einige Übereinstimmungen auf. Der in dieser Untersuchung definierte Grenzbereich von 0,20 IU/ml bis 0,50 IU/ml basiert auf dem im Jahr 2009 von Pai et al. vorgeschlagenen Grenzbereich von 0,20 IU/ml bis 0,50 IU/ml für den QFT-GIT (Pai et al. 2009, 1ff.). Gründe für die Anwendung dieses Intervalls waren die gleichmäßige Verteilung der Werte ober- und unterhalb des vom Hersteller angegebenen Cut-off-Wertes wie auch der Gewinn einer aussagekräftigen und laborseitig realisierbaren Probenmenge. Bei Erhebung der Daten für die vorliegende Untersuchung wurden Proben mit uneindeutigen Testergebnissen im ersten Testdurchgang ausgeschlossen. Bei Wiederholung des QFT-GIT an den 296 Plasmaproben,

welche die in Kapitel 5.1 aufgeführten Kriterien erfüllten, ergaben sich 136 positive und 160 negative Testresultate, jedoch keine uneindeutigen Testresultate. Auch Detjen et al. verzeichneten in ihrer Untersuchung einen nur geringen Anteil an uneindeutigen Testergebnissen, was die Autoren teilweise auf die strikte Standardisierung der Probengewinnung und der Laborroutine zurückführen (Detjen et al. 2009, 1173). Die Untersuchung von Metcalfe et al. über die Testvariabilität des QFT-GIT zeigt, dass die zu erwartende Normalverteilung bei Testwiederholung Differenzen der Interferon- γ -Antworten im Grenzbereich von $\pm 0,24$ IU/ml beinhaltet (Metcalfe et al. 2013, 206ff.). Dieser Wert ist beinahe identisch mit den in der vorliegenden Untersuchung nach Testwiederholung errechneten Differenzen von $\pm 0,23$ IU/ml der Interferon- γ -Antworten im Grenzbereich bei Annahme der Normalverteilung und untermauert die Aussagekraft der in dieser Untersuchung gewonnenen Ergebnisse. Metcalfe et al. kommen zu dem Schluss, dass es sinnvoll sei, aufgrund der Testvariabilität positive IGRA-Testergebnisse mit Interferon- γ -Werten unter 0,59 IU/ml vorsichtig zu bewerten (Metcalfe et al. 2013, 206ff.). Diese Aussage kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung für IGRA-Testergebnisse mit Interferon- γ -Werten im Grenzbereich von 0,20 IU/ml bis 0,50 IU/ml bestätigt werden, da auch in dieser Arbeit eine erhöhte Testvariabilität des QFT-GIT mit der Konsequenz einer nur mäßigen Reproduzierbarkeit quantitativer IGRA-Messergebnisse im Grenzbereich aufgezeigt werden konnte.

Für die vorliegende Untersuchung werden folgende Limitationen aufgezeigt: Zunächst sind auch bei Standardisierung der Laborabläufe und Einhaltung der Herstellerangaben Fehler bei der Durchführung des QFT-GIT und des ELISA möglich, die zu Variabilität der Testergebnisse führen können und somit die Reproduzierbarkeit beeinflussen können. Es ist beispielsweise denkbar, dass die Lagerung der Plasmaproben bei 2°C bis 8°C für bis zu 28 Tage die Stabilität des Interferon- γ beeinflussen könnte. Diese Problematik wurde bisher von Detjen et al. untersucht, wobei jedoch kein signifikanter Einfluss der sachgemäßen Lagerung der Plasmaproben auf die QFT-GIT-Testergebnisse festgestellt werden konnte (Detjen et al. 2009, 1170ff.). Da keine Plasmaproben mit QFT-GIT-Testergebnissen außerhalb des gewählten Grenzbereichs berücksichtigt werden konnten, lässt sich in dieser Untersuchung keine Aussage über die Reproduzierbarkeit von quantitativen IGRA-Messergebnissen unterhalb von 0,20 IU/ml und oberhalb von 0,50 IU/ml treffen. Insgesamt sollte die Datenlage zum Forschungsfeld der Untersuchung der Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnisse bei IGRAs weiter ausgebaut werden. Es wäre wünschenswert zu evaluieren, ob sich der in dieser Untersuchung dargestellte Zusammenhang der Zunahme der Reproduzierbarkeit von IGRA-Testergebnissen derselben Plasmaprobe mit zunehmender Distanz zum Cut-off-Wert auch bei breiter gefassten Interferon- γ -Intervallen bestätigt. Weiterhin wäre es für den klinischen Alltag von großem Interesse, auf die Daten von umfassenderen Studien mit größerem Probenaufkommen zur Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnisse bei IGRAs anhand derselben Plasmaprobe zurückgreifen zu können.

8. Schlussfolgerung

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnisse bei IGRAs im Grenzbereich wurden Plasmaproben mit QFT-GIT-Testergebnissen mit Interferon- γ -Antworten im Grenzbereich ein zweites Mal mittels QFT-GIT getestet und die gewonnenen Daten von erstem und zweitem Testdurchgang gegenübergestellt. Diese Untersuchung soll dazu beitragen, die Testvariabilität des QFT-GIT im Grenzbereich besser einschätzen zu können und eine Aussage über die Reproduzierbarkeit des QFT-GIT bei quantitativen Messergebnissen im Grenzbereich treffen zu können. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen auf, dass die Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnisse des IGRAs im Grenzbereich mit der Nähe zum Cut-off-Wert deutlich abnimmt. Die Übereinstimmung eines QFT-GIT-Testergebnisses mit Interferon- γ -Werten im Grenzbereich mit dem Testergebnis nach Wiederholung des QFT-GIT an derselben Plasmaprobe konnte in dieser Untersuchung nach Berechnung des Cohens-Kappa-Koeffizienten als nur moderat bezeichnet werden. Aufgrund der zu erwartenden Normalverteilung bei Testwiederholung muss bei IGRA-Testergebnissen im Grenzbereich mit Differenzen der Interferon- γ -Antwort von bis zu 0,23 IU/ml gerechnet werden. Bei Testwiederholung sind in dieser Normalverteilung die ausgeprägte Testvariabilität des QFT-GIT im Grenzbereich und damit die nur mäßige Reproduzierbarkeit quantitativer IGRA-Messergebnisse im Grenzbereich begründet. Dieser Zusammenhang führt zum Auftreten von hohen Diskordanzraten von bis zu 48,6% nahe des Cut-off-Wertes.

Durch die vorliegende Arbeit kann ein Anwender des IGRAs auf eine Datengrundlage zurückgreifen, die dazu beiträgt, IGRA-Testergebnisse mit Messwerten der Interferon- γ -Antwort im Grenzbereich differenzierter beurteilen zu können und den vorher nur vage beschriebenen Grenzbereich mit konkreten Daten zur Reproduzierbarkeit quantitativer IGRA-Messergebnisse zu belegen. Aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchung kann angeraten werden, IGRA-Testergebnisse mit quantitativen Werten der Interferon- γ -Antwort im Grenzbereich von 0,20 IU/ml bis einschließlich 0,50 IU/ml vorsichtig zu beurteilen, da die Testvariabilität des IGRAs zu einer erhöhten Ungenauigkeit im Grenzbereich um den Cut-off-Wert von 0,35 IU/ml führt. Ein sorgfältiges Beurteilen von Anamnese, dem Infektionsrisiko durch Indexfälle, dem klinischem Erscheinungsbild sowie dem individuellem Risiko für aktive Tuberkulose kann bei IGRA-Testergebnissen mit Interferon- γ -Antwort im Grenzbereich einerseits dazu beitragen, auf eine möglicherweise unnötige, monatelange antibiotische Therapie verzichten zu können und andererseits verhindern, dass eine LTBI unerkannt bleibt, was möglicherweise ohne entsprechende Behandlung zur Progression zu aktiver Tuberkulose führen würde.

9. Ausblick

Das Testprinzip der Quantiferon-IGRAs ist seit seiner Entwicklung im Jahr 2001 steten Veränderungen unterworfen. Mit der Einführung des inzwischen weitverbreiteten QFT-GIT im Jahr 2007 wurde dessen Vorgänger, der GFT-G, durch einen deutlich leichter zu handhabenden und im Hinblick auf die Sensitivität verbesserten IGRA ersetzt (Harada et al. 2008, 348ff.; Moon, Hur 2013, 222). Zahlreiche Studien haben die Stärken und Defizite des QFT-GIT aufgezeigt, sodass in den letzten Jahren eine größtenteils umfangreiche Datengrundlage zu vielen Aspekten des QFT-GIT geschaffen wurde. Die Weiterentwicklung des Testprinzips der IGRAs wurde von den Herstellern kontinuierlich vorangetrieben, sodass in naher Zukunft auch ein neuer IGRA der Firma QIAGEN, der QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT-Plus), breite Anwendung finden wird.

Die Testprinzipien von QFT-GIT und QFT-Plus sind in grundlegenden Aspekten vergleichbar. Wie beim QFT-GIT erfolgt auch beim QFT-Plus zunächst die Stimulation der Lymphozyten mittels spezifischer *M. tuberculosis*-Antigene direkt im Blutentnahmeröhrchen; nach einer Inkubationszeit von 16 bis 24 Stunden und Zentrifugation wird die Menge an Interferon- γ in IU/ml mittels ELISA gemessen (QIAGEN 2015, 6). Der entscheidende Unterschied zum QFT-GIT besteht darin, dass beim QFT-Plus zwei verschiedene TB-Antigen-Röhrchen, TB1- und TB2-Röhrchen, verwendet werden. Beide TB-Antigen-Röhrchen enthalten die spezifischen Antigenpeptide ESAT-6 und CFP-10, die eine Immunreaktion der CD4+ T-Lymphozyten bewirken können, wie sie auch für das Testprinzip des QFT-GIT beschrieben ist (QIAGEN 2015, 4ff.). Im TB2-Röhrchen sind jedoch zusätzlich bestimmte Peptide enthalten, welche eine Immunreaktion der zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten induzieren können. Liegt der Messwert für Interferon- γ in IU/ml eines der beiden TB-Antigen-Röhrchen deutlich über dem Wert der Negativkontrolle, gilt der Test als positiv; der diagnostische Cut-off-Wert liegt wie beim QFT-GIT bei 0,35 IU/ml (QIAGEN 2015, 4ff.).

Es gibt Hinweise, dass auch CD8+ T-Lymphozyten an der Abwehr von *M. tuberculosis* beteiligt sind und CD8+ T-Lymphozyten bei aktiver Tuberkulose häufiger nachgewiesen werden als bei LTBI; über die Aufschlüsselung der Immunantwort in die Reaktionen von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten könnte eine Unterscheidung zwischen aktiver Tuberkulose und LTBI möglich sein (Brookes et al. 2003, 3293; Rozot et al. 2013, 1568). Ein solcher Zusammenhang muss in entsprechenden Untersuchungen bestätigt werden. Weiterhin ist nachzuweisen, ob signifikante Vorteile und ein diagnostischer Gewinn bei Anwendung des QFT-Plus gegenüber dem gut evaluierten QFT-GIT zu erwarten sind. Bis eine ähnlich fundierte Datengrundlage wie beim QFT-GIT geschaffen ist, bleibt es abzuwarten, wie sich der QFT-Plus im klinischen Alltag bewährt. Ob und inwiefern die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung im Hinblick auf die Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnisse im Grenzbereich auf den QFT-Plus übertragbar sind, könnten weiterführende Studien aufzeigen.

10. Zusammenfassung

Interferon-gamma-Release-Assays (IGRAs) haben in den letzten Jahren für die Diagnostik der Tuberkulose immer mehr an Bedeutung gewonnen. Sie kommen insbesondere bei Umgebungsuntersuchungen von Indexfällen zur Detektion von LTBI zur Anwendung. IGRAs werden im Rahmen der Tuberkulosedagnostik des Öffentlichen Gesundheitsdienstes auch an der Dienststelle des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim verwendet, in dessen Laboratorien auch die in der vorliegenden Untersuchung evaluierten Daten erhoben wurden. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Reproduzierbarkeit von quantitativen IGRA-Messergebnissen, die im Grenzbereich um den diagnostischen Cut-off-Wert liegen. IGRA-Testergebnisse mit quantitativen Interferon- γ -Werten in diesem Grenzbereich können durch die für IGRAs typische Testvariabilität schwierig zu interpretieren sein. Daher erschien es sinnvoll, zu evaluieren, mit welcher Präzision sich quantitative IGRA-Messergebnisse im Grenzbereich reproduzieren lassen. Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit von IGRA-Messergebnissen im Grenzbereich wurden 296 Plasmaproben mit IGRA-Messergebnissen in einem definierten Intervall um den Cut-off-Wert ein zweites Mal mittels IGRA getestet. Die Werte aus erstem und zweitem Testdurchgang wurden einander gegenübergestellt und die Reproduzierbarkeit der quantitativen Messergebnisse wurde mithilfe statistischer Methoden analysiert.

Von 296 Testergebnissen aus dem ersten Testdurchgang verhielten sich beim zweiten Testdurchgang 226 Testergebnisse (76,4%) konkordant und 70 Testergebnisse (23,6%) diskordant zu den Testergebnissen des ersten Durchgangs. Von Diskordanz betroffen waren 41 zunächst positive Testergebnisse sowie 29 zunächst negative Testergebnisse. Die Übereinstimmung der Ergebnisse der beiden Testdurchgänge war moderat ($\kappa = 0,52$; 95% CI 0,43-0,62). Die bei Testwiederholung zu erwartende Normalverteilung für Werte der Interferon- γ -Antwort im Grenzbereich beinhaltete Werte von $\pm 0,23$ IU/ml. Diese Testvariabilität der quantitativen Messergebnisse verdeutlicht, weshalb es im Grenzbereich vermehrt zu diskordanten IGRA-Testergebnissen kommt. Die Untersuchungsergebnisse zeigen weiterhin, dass eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Diskordanzen und der Nähe der zugrundeliegenden Interferon- γ -Antwort des ersten Testdurchgangs zum Cut-off-Wert besteht. Für zwei bestimmte Intervallabschnitte des Grenzbereichs, die dem Cut-off-Wert am nächsten liegen, wurden mit 37,3% und 48,6% die höchsten Anteile an diskordanten Testergebnissen festgestellt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung legen nahe, IGRA-Testergebnisse mit Interferon- γ -Werten im Grenzbereich vorsichtig zu beurteilen. Es konnte eine deutliche Testvariabilität einhergehend mit einer mäßigen Reproduzierbarkeit der quantitativen IGRA-Messergebnisse im Grenzbereich aufgezeigt werden. Die durch die Ergebnisse dieser Untersuchung geschaffene Datengrundlage soll eine differenzierte Beurteilung von IGRA-Testergebnissen mit quantitativen Interferon- γ -Werten im Grenzbereich ermöglichen.

11. Literaturverzeichnis

1. Altman, D.G. (1991): Practical Statistics for Medical Research. Chapman and Hall/CRC.
2. Altman, D.G., Machin, D., Bryant, T.N., Gardner, M.J. (2000): Statistics with Confidence. BMJ Books.
3. American Society for Testing and Materials International (Hrsg.) (2009): What are repeatability and reproducibility? URL:
http://www.astm.org/SNEWS/MA_2009/datapoints_ma09.html (Stand: 13.09.2015).
4. Anibarro, L., Trigo, M., Villaverde, C., Pena, A., Cortizo, S., Sande, D., Pazos, R.A., González-Fernández A. (2011): Interferon- γ Release Assays in tuberculosis contacts: is there a window period? In: Eur. Respir. J., 2011, 37, 215-217.
5. Bland, J.M., Altman, D.G. (1986): Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. In: Lancet, 1986, 1, 307-310.
6. Böttger, E.C. (2001): Die Familie der Mycobacteriaceae. In: Köhler, W., Eggers, H.J., Fleischer B., Marre, R., Pfister, H., Pulverer, G. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie. Urban & Fischer. 407-434.
7. Brookes, R.H., Pathan, A., McShane H., Hensmann M., Price D., Hill, A. (2003): CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular Mycobacterium tuberculosis growth in activated human macrophages. In: Eur. J. Immunol., 33, 3293-3302.
8. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz (1992): Asylgesetz. URL:
http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/asylvfg_1992/gesamt.pdf
(Stand: 26.11.2015).
9. Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz (2000): Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG). URL:
<http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/ifsg/gesamt.pdf> (Stand: 26.07.2015).
10. Cellestis, a QIAGEN Company (2013): QuantiFERON®-TB Gold (QFT®) ELISA Packungsbeilage 07/2013. URL:
<http://www.quantiferon.com/irm/content/PI/QFT/2PK/DE.pdf> (Stand: 08.05.2015).

11. De Keyser, E., De Keyser, F., De Baets, F. (2014): Tuberculin skin test versus interferon-gamma release assays for the diagnosis of tuberculosis infection. In: *Acta Clinica Belgica*, 2014, 5, 358-366.
12. Detjen, A.K., Loebenberg, L., Grewal, H.M., Stanley, K., Gutschmidt, A., Kruger, C., Du Plessis, N., Kidd, M., Beyers, N., Walzl, G., Hesselning, A.C. (2009): Short-term reproducibility of a commercial interferon gamma release assay. In: *Clin. Vaccine Immunol.*, 2009, 16(8), 1170-1175.
13. Diel, R., Loddenkemper, R., Meywald-Walter, K., Gottschalk, R., Nienhaus, A. (2009): Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In Tube assay, and T-Spot. TB test in contact investigations for tuberculosis. In: *Chest*, 2009, 135, 1010-1018.
14. Diel, R., Loddenkemper, R., Nienhaus, A. (2010): Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. In: *Chest*, 2010, 137, 952-968.
15. Diel, R., Loytved, G., Nienhaus, A., Castell, S., Detjen, A., Geerdes-Fenge, H., Haas, W., Hauer, B., Königstein, B., Maffei, D., Magdorf, K., Priwitzer, M., Zellweger, J.P., Loddenkemper, R. (2011a): Neue Empfehlungen des Deutschen Zentralkomitees (DZK) für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose. In: *Pneumologie*, 2011, 65, 359-378.
16. Diel, R., Goletti, D., Ferrara, G., Bothamley, G., Cirillo, D., Kampmann, B., Lange, C., Losi, M., Markova, R., Migliori, G.B., Nienhaus, A., Ruhwald, M., Wagner, D., Zellweger, J.P., Huitric, E., Sandgren A., Manissero, D. (2011b): Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systematic review and meta-analysis. In: *Eur. Respir. J.*, 2011, 37, 88–99.
17. Diel, R., Loddenkemper, R., Nienhaus, A. (2012): Predictive value of interferon- γ release assays and tuberculin skin testing for predicting progression from latent TB infection to disease state: a meta-analysis. In: *Chest*, 2012, 142, 63-75.
18. du Prel, J.B., Hommel, G., Röhrig, B., Blettner, M. (2009): Confidence interval or p-value? Part 4 of a series on evaluation of scientific publications. In: *Dtsch. Ärztebl. Int.*, 2009, 106 (19), 335-339.
19. Fong, K.S., Tomford, J.W., Teixeira, L., Fraser, T.G., van Duin, D., Yen-Lieberman, B., Gordon, S.M., Miranda, C. (2012): Challenges of interferon-gamma release assay conversions in serial testing of health-care workers in a tuberculosis control program. In: *Chest*, 2012, 142, 55-62.

20. Groß, U. (2013): Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Thieme.
21. Grouven, U., Bender, R., Ziegler, A., Lange, S. (2007): Der Kappa-Koeffizient. In: Dtsch. Med. Wochenschr., 2007, 132, e65-e68.
22. Hammann, M., Jördens, J., Schecker, H. (2014): Übereinstimmung zwischen Beurteilern: Cohens Kappa (κ). URL: <http://static.springer.com.emedien.ub.uni-muenchen.de/sgw/documents/1426183/application/pdf/Cohens+Kappa.pdf> (Stand: 03.11.2015).
23. Hang, N.T.L., Lien, L.T., Kobayashi, N., Shimbo, T., Sakurada, S., Thuong, P.H., Hong, L.T., Tam, D.B., Hijikata, M., Matsushita, I., Hung, N.V., Higuchi, K., Harada, N., Keicho, N. (2011): Analysis of Factors Lowering Sensitivity of Interferon- γ Release Assay for Tuberculosis. In: PLoS ONE 6(8), e23806. doi:10.1371/journal.pone.0023806.
24. Harada, N., Higuchi, K., Yoshiyama, T., Kawabe, Y., Fujita A., Sasaki, Y., Horiba, M., Mitarai, S., Yonemaru, M., Ogata, H., Ariga, H., Kurashima, A., Wada, A., Takamori, M., Yamagishi, F., Suzuki, K., Mori, T., Ishikawa N. (2008): Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma Assays for M. tuberculosis infection. In: Journal of Infection, 2008, 56, 348-353.
25. Hof, H., Dörries, R. (2014): Medizinische Mikrobiologie. Thieme.
26. Hoffmann, G., Guder, W., Aufenanger, J. (2014): Diagnostische Strategien. In: Hofmann, W., Aufenanger, J., Hoffmann, G. (Hrsg.): Klinikhandbuch Labordiagnostische Pfade: Einführung-Screening-Stufendiagnostik. Walter de Gruyter GmbH. 7-15.
27. Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Universität München (IBE München) (o.J.): Diagnostik zur Vorlesung Prinzipien der klinischen Epidemiologie. URL: http://www.ibe.med.uni-muenchen.de/lehre/lehrveranst/lehr_a/modul1-15/material/archiv/archiv_ss08/seminar_diagnostik_1.pdf (Stand: 22.10.2015).
28. Kaufmann, S.H.E. (2009): Antigen-Antikörper-Reaktion: Grundlagen serologischer Methoden. In: Hahn, H., Kaufmann, S., Schulz, T., Suerbaum, S. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer. 68-73.

29. Kwiecien, R., Kopp-Schneider, A., Blettner, M. (2011): Concordance analysis—part 16 of a series on evaluation of scientific publications. In: *Dtsch. Ärztebl. Int.*, 2011, 108 (30), 515-21.
30. Lange, C., Schaberg, T., Diel, R., Greinert, U. (2006): Aktueller Stand der Tuberkulosedagnostik. In: *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 2006, 131, 341–347.
31. Lee, S.W., Oh, D.K., Lee, S.H., Kang, H.Y., Lee, C.T., Yim J.J. (2011): Time interval to conversion of interferon- γ Release Assay after exposure to tuberculosis. In: *Eur. Respir. J.*, 2011, 37, 1447-1452.
32. Menzies, D., Pai, M., Comstock, G. (2007): Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. In: *Ann. Intern. Med.*, 2007, 146, 340-354.
33. Metcalfe, J.Z., Cattamanchi, A., McCulloch, C., Lew, J., Ngan, P.H., Graviss, E.A. (2013): Test Variability of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay in Clinical Practice. In: *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 2013, 187(2), 206-211.
34. Metcalfe, J.Z., Cattamanchi, A., McCulloch, C., Lew, J., Ngan, P.H., Graviss, E.A. (2013): Test Variability of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay in Clinical Practice. In: *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 2013, 187(2), 206-211. Mit Bezug auf: American Society for Testing and Materials (Hrsg.) (2012): E456 standard terminology relating to quality and statistics. Verfügbar unter URL: <http://www.Astm.Org/Standards/E456.htm>.
35. Moon, H.W., Hur, M. (2013): Interferon- γ Release Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: an Updated Review. In: *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 2013, 43(2), 221-229.
36. Oxford Immunotec Limited (2013): T-SPOT.TB® Package Insert. URL: <http://www.oxfordimmunotec.com/international/wp-content/uploads/sites/3/PI-TB-IVD-UK-v2f288.pdf> (Stand: 16.08.2015).
37. Pai, M., Riley, L.W., Colford, J.M. (2004): Interferon- γ assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. In: *Lancet Infect. Dis.*, 2004, 4, 761-776.
38. Pai, M., O'Brien, R. (2007): Serial testing for tuberculosis: can we make sense of T cell assay conversions and reversions? In: *PLoS Med.*, 2007, 4 (6), 980-983.
39. Pai, M., Zwerling, A., Menzies, D. (2008): Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. In: *Ann. Intern. Med.*, 2008, 149, 177-184.

40. Pai, M., Joshi, R., Dogra, S., Zwerling, A., Gajalakshmi, D., Goswami, K., Reddy, M.V., Kalantri, S., Hill, P.C., Menzies, D., Hopewell, P.C. (2009): T-cell assay conversions and reversions among household contacts of tuberculosis patients in rural India. In: *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, 2009, 13(1), 84-92.
41. Pai, M., Denking, C.M., Kik, S.V., Rangaka, M.X., Zwerling, A., Oxlade, O., Metcalfe, J.Z., Cattamanchi, A., Dowdy, D.W., Dheda, K., Banaei, N. (2014): Gamma Interferon Release Assays for Detection of Mycobacterium tuberculosis Infection. In: *Clinical Microbiology Reviews*, 2014, 27(1), 3-20.
42. Perry, S., Sanchez, L., Yang, S., Agarwal, Z., Hurst, P., Parsonnet, J. (2008): Reproducibility of QuantiFERON-TB gold in-tube assay. In: *Clin. Vaccine. Immunol.*, 2008, 15(3), 425-432.
43. QIAGEN GmbH (2015): QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) ELISA Packungsbeilage 02/2015. URL: <http://www.quantiferon.com/irm/content/PI/QFT/PLUS/2PK-Elisa/DE.pdf> (Stand: 14.08.2015).
44. Rangaka, M.X., Wilkinson, K.A., Glynn, J.R., Ling, D., Menzies, D., Mwansa-Kambafwile, J., Fielding, K., Wilkinson, R.J., Pai, M. (2012): Predictive value of interferon- γ release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. In: *Lancet Infect. Dis.*, 2012, 12, 45–55.
45. Ringshausen, F.C., Nienhaus, A., Torres Costa, J., Knoop, H., Schlösser, S., Schultze-Werninghaus, G., Rohde, G. (2011): Within-subject variability of Mycobacterium tuberculosis-specific gamma interferon responses in German health care workers. In: *Clin. Vaccine. Immunol.*, 2011, 18, 1176-1182.
46. Robert Koch-Institut (2012): Schutzimpfung gegen Tuberkulose: Häufig gestellte Fragen und Antworten. URL: http://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/Tuberkulose/FAQ-Liste_Tuberkulose_Impfen.html#FAQId2407392 (Stand: 28.05.2015).
47. Robert Koch-Institut (2013): RKI-Ratgeber für Ärzte. URL: http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Tuberkulose.html (Stand: 03.06.2015).
48. Robert Koch-Institut (2014): Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2013. URL: http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/T/Tuberkulose/Download/TB2013.pdf?__blob=publicationFile (Stand: 03.06.2015).

49. Robert Koch-Institut (2015a): Epidemiologisches Bulletin 11/12 2015. URL: http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2015/Ausgaben/11_12_15.pdf?__blob=publicationFile (Stand: 03.06.2015).
50. Robert Koch-Institut (2015b): Robert Koch. URL: http://www.rki.de/DE/Content/Institut/Geschichte/robert_koch_node.html (Stand 19.09.2015).
51. Robert Koch-Institut (2015c): Bericht zur Epidemiologie der Tuberkulose in Deutschland für 2014. URL: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/T/Tuberkulose/Download/TB2014.pdf;jsessionid=B7A1F994084FCC2F4B2406A6E5843CBA.2_cid390?__blob=publicationFile (Stand: 21.05.2016).
52. Rozot, V., Vigano, S., Mazza-Stalder, J., Idrizi, E., Day, C.L., Perreau, M., Lazor-Blanchet, C., Petruccioli, E., Hanekom, W., Goletti, D., Bart, P.A., Nicod, L., Pantaleo, G., Harari, A. (2013): Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. In: Eur. J. Immunol., 2013, 43, 1568-1577.
53. Schablon, A., Harling, M., Diel, R., Ringshausen, F.C., Torres Costa, J., Nienhaus, A. (2010): Serial testing with an interferon- γ release assay in German healthcare workers. In: GMS Krankenhaushyg. Interdiszip., 2010, 5(2), 1-8.
54. Sepkowitz K.A. (1996): How Contagious Is Tuberculosis? In: Clinical Infectious Diseases, 1996, 23, 954-962.
55. Sester, M., Sotgiu, G., Lange, C. (2011): Interferon- γ Release Assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. In: Eur. Respir. J., 2011, 37, 100-111.
56. Tiemersma, E.W., van der Werf, M.J., Borgdorff, M.W., Williams, B.G., Nagelkerke, N.J.D. (2011): Natural History of Tuberculosis: Duration and Fatality of Untreated Pulmonary Tuberculosis in HIV Negative Patients. A Systematic Review. In: PLoS ONE 6(4): e17601. doi:10.1371/journal.pone.0017601.
57. Torres Costa, J., Silva, R., Sá, R., Cardoso, M.J., Nienhaus, A. (2009): Tuberculosis screening in Portuguese healthcare workers using the tuberculin skin test and the interferon-gamma release assay . In: Eur. Respir. J., 2009, 34(6), 1423-1428.

58. van Zyl-Smit, R.N., Zwerling, A., Dheda, K., Pai, M. (2009): Within-Subject Variability of Interferon- γ Assay Results for Tuberculosis and Boosting Effect of Tuberculin Skin Testing: A Systematic Review. In: PLoS ONE 4(12), e8517. doi:10.1371/journal.pone.0008517.
59. Veerapathran, A., Joshi, R., Goswami, K., Dogra, S., Moodie, E.E., Reddy, M.V., Kalantri, S., Schwartzman, K., Behr, M.A., Menzies, D., Pai, M. (2008): T-cell assays for tuberculosis infection: deriving cut-offs for conversions using reproducibility data. In: PLoS One. 2008, 3(3), e1850.
60. Vogt, T. (2012): Moderne Tuberkulose tests im Fokus: QuantiFERON®-TB Gold. URL: http://www.lagus.mv-regierung.de/cms2/LAGuS_prod/LAGuS/de/ges/InfektionsschutzPraevention/Infektion_skrankheiten/Tuberkulose/_Experten/Qualitaetszirkel_Tuberkulose/index.jsp (Stand: 21.07.2015).
61. Weiß, C. (2010): Basiswissen Medizinische Statistik. Springer.
62. Whitworth, W.C., Hamilton, L.R., Goodwin, D.J., Barrera, C., West, K.B., Racster, L., Daniels, L.J., Chuke, S.O., Campbell, B.H., Bohanon, J., Jaffar, A.T., Drane, W., Maserang, D., Mazurek, G.H. (2012): Within-Subject Interlaboratory Variability of QuantiFERON-TB Gold In-Tube Tests. In: PLoS ONE 7(9), e43790. doi:10.1371/journal.pone.0043790.
63. World Health Organization (2014a): TB Report 2014. URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf (Stand: 26.05.2015).
64. World Health Organization (2014b): Drug-resistant TB. Surveillance & Response. Supplement Global Tuberculosis Report 2014. URL: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr14_supplement_web_v3.pdf (Stand: 26.05.2015).
65. World Health Organization (2015a): Latent Tuberculosis Infection (LTBI). URL: <http://www.who.int/tb/challenges/ltbi/en/> (Stand: 28.05.2015).
66. World Health Organization (2015b): The END TB Strategy-Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015. URL: http://www.who.int/tb/post2015_TBstrategy.pdf (Stand: 07.07.2015).

67. World Health Organization (2015c): TB Report 2015. URL:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1
(Stand: 02.11.2015).
68. Ziesing, S., Heim, A., Vonberg, R.P. (2012): Methoden der mikrobiologischen Diagnostik. In: Suerbaum, S., Hahn, H., Burchard, G.D., Kaufmann, S.H.E., Schulz, T.F. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer. 129-147.

12. Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

Reinhold, Lisa Annabelle

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

"Reproduzierbarkeit quantitativer Messergebnisse bei
Interferon-gamma-Release-Assays im Grenzbereich"

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 14.08.2018

Ort, Datum

Lisa Reinhold

Unterschrift Doktorandin

13. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Dr. phil. Andreas Sing und Herrn Dr. med. Nikolaus Ackermann danke ich sehr für die Überlassung des Themas der Dissertation, die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit und die hervorragende Betreuung.

Vielen Dank an Herrn Dr. med. Andreas Zapf, Präsident des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, für seine freundliche Einwilligung zur Einreichung der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit als Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Frau Hermine Roth und allen Mitarbeitern der Abteilung Tuberkulose der Dienststelle Oberschleißheim des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit für ihre Unterstützung.