

Nye analysemetoder av blod for påvisning av tuberkulose

Nye, spesifikke analyser av blodprøver for påvisning av infeksjon med *Mycobacterium tuberculosis* kan representere et diagnostisk frem-skrutt, både ved latent tuberkulose og ved mistanke om aktiv tuberkuløs sykdom. Testene krever bare ett besøk, gir et ja/nei-svar, har høy spesifisitet og krever ikke spesielt utdant personell for setting og tolking. Dersom de lovende erfaringer kan bekreftes i klinisk praksis, kan den kutane tuberkulintesten ha utspilt sin rolle i kontrollen av tuberkulose.

Kutan tuberkulintest har i rundt 100 år vært det viktigste diagnostiske hjelpemidlet ved oppsporing av tuberkulosesmitte i miljøet rundt en smitteførende tuberkulose (1). I Norge har Pirquets metode vært brukt, inntil Mantoux-metoden ble innført i 2004. Testen krever opplæring av personell i setting og tolking av prøven, og testpersonen må komme tilbake for avlesning etter 2–3 døgn. Mange kommer ikke til avlesning (2). Testen er uspesifikk, fordi BCG-vaksinering også fører til positiv tuberkulintest. Dersom en person både er BCG-vaksinert og er blitt eksponert for tuberkulose, kan det være umulig å avgjøre om vedkommende er blitt smittet eller ikke. Tuberkulintesten kan også være positiv ved infeksjon med atypiske mykobakterier.

Gjennom flere årtier har det vært drevet forskning på mykobakterielle antigener. Hovedmålet for denne forskningen har vært ønsket om en mer effektiv vaksine mot tuberkulose enn BCG-vaksinen. Et resultat av denne forskningen er nye analysemetoder av blod som påviser infeksjon med tuberkulose på en sikrere måte. Ved filtrering av mykobakteriekulturer fremkommer det komplekse blandinger av proteiner. Interessen har særlig konsentrert seg om proteiner som *Mycobacterium tuberculosis* utskiller aktivt, da disse trolig setter i gang en immunreaksjon hos den smittede i en tidlig fase av infeksjonen.

I 1995 karakteriserte en forskergruppe ved Statens Serum institutt i København et nytt småmolekylært antigen (3) som blir utskilt aktivt under bakteriell vekst. Det ble kalt ESAT-6 (6 kDa early secretory antigenic target) og kodes av et genområde i

M tuberculosis-komplekset (dvs. *M tuberculosis*, *M africanum*, *M bovis*, *M microti*). Proteinet viste seg å ha en uvanlig evne til å provosere en immunrespons i form av produksjon av interferon- γ fra vertens T-lymfocytter. Fra samme genområde hos *M tuberculosis*, kalt RD1 (region of difference 1), ble det så karakterisert et annet lavmolekylært kultur-filtrat-protein, CFP-10, som kodes av et tilstøtende gen (4). CFP-10 synes å ha de samme egenskaper som ESAT-6, og ved å kombinere de to i en diagnostisk test økes sensitiviteten (5).

BCG-stammen (*Bacillus Calmette-Guérin*; BCG) ble i begynnelsen av 1920-årene fremstilt ved en laboratoriemessig svekking av en *M. bovis*-stamme. Det er holdpunkter for at bakterien under denne svekkingsprosessen faktisk mistet RD1-genområdet som koder for ESAT-6/CFP-10, og dermed skiller BCG ikke ut disse proteinene (6). RD1-området har for øvrig vist seg å være helt essensielt for virulensen av *M tuberculosis* (7). En blodprøve som måler interferon- γ -respons som følge av ESAT-6/CFP-10-stimulering, vil altså ikke bli positiv som følge av BCG-vaksine, og vil heller ikke slå ut ved infeksjon med de fleste atypiske mykobakterier, som heller ikke utskiller ESAT-6/CFP-10. Enkelte unntak finnes: *M kansasii*, *M marinum*, og *M szulgai*.

Nye analysemetoder

To blodtester er nå kommersielt tilgjengelig og måler, ved helt ulik metodikk, hvorvidt testpersonens T-lymfocytter produserer interferon- γ ved eksponering for ESAT-6 og/eller CFP-10-antigenene. De kalles RD1-interferon- γ -baserte tester. Begge tester trenger kun ett besøk med fullblodprøve fra testpersonen.

QuantIFERON-TB Gold (Cellestis International, Australia) ble godkjent av legemiddelmyndighetene i USA i desember 2004. Så snart som mulig etter prøvetaking og senest innen 12 timer, inkuberes testpersonens hepariniserte fullblodprøve i brønner som tilsettes henholdsvis positiv kontroll (mitogen), negativ kontroll (saltvann) og tuberkulinantigenene ESAT-6 og CFP-10. Det høstede plasma fra disse brønnene kan, hvis ønskelig, lagres i kjøleskaps-temperatur (2–8 °C) i opptil 14 dager, ev. nedfryst ved $\leq +20$ °C i minst tre måneder. Påvisning av interferon- γ gjøres ved ELISA-teknikk, og prosedyren er oppgitt å ta ca. tre timer. Konsentrasjonen av interferon- γ avleses maskinelt.

CLINISPOT (Oxford Immunotec, UK) benytter enzym-linkede immunospotassay på mikrotiterplater (ELISPOT). Blod samles i spesielle blodprøveglass, og monokleære celler separeres etter standardmetoder. Fire brønner per testperson tilsettes henholdsvis negativt kontrollmedium, positiv kontroll (mitogen), ESAT-6 og CFP-10. På forhånd er brønnene dekket med en membran som inneholder anti-interferon- γ . Hvis testpersonen har T-lymfocytter som reagerer med interferon- γ -produksjon ved eksponering for *M tuberculosis*-antigenene, vil interferon- γ binde seg til antistoffene i membranen på det stedet lymfocytten ligger. Etter en utvaskingsprosedyre som fjerner overflødig celler og antigener, tilsettes et sekundært interferon- γ -antistoff som er merket med et fargestoff. På denne måten fremkommer det «fotavtrykk» etter disse lymfocytene, som ses som mørke prikker (spots), som kan telles manuelt eller ved en spesiell tellemaskin fra produsenten. Begge testene kan gi svar samme dag eller dagen etter prøvetakingen.

Testene er kvantitative, men basert på utarbeidede grenseverdier gir de et ja/nei-svar. Det er hittil ikke gjort studier der man har sammenliknet de to testenes ytelse direkte. QuantIFERON-TB Gold er oppfattet som logistisk enklere, mens man kan tenke seg at CLINISPOT™ har en høyere sensitivitet, særlig hos immunkompromiterte personer med få T-lymfocytter. Dette henger sammen med ELISPOT-metodikkens generelt meget høye sensitivitet.

Latent tuberkulose

Sensitiviteten ved tuberkulosesmitte uten sykdom er ikke mulig å fastslå eksakt, da det ikke finnes noen gullstandard. Imidlertid kan flere studier tyde på at de RD1-interferon- γ -baserte testene, der man kombinerer både ESAT-6 og CFP-10, har en sensitivitet som er like god eller bedre enn tuberkulintesten hos nærkontakter til personer med smitteførende tuberkulose (8–12).

Når det gjelder spesifisitet, synes studiene å bekrefte at testene er betydelig bedre enn tuberkulintesten. Et stort praktisk problem ved tuberkulinundersøkelse av for eksempel skolebarn i Norge med gammelt tuberkulin (OT) eller rensset proteinderivat (purified protein derivate; PPD) har vært det store antall positive tester uten anamnesticke opplysninger om kontakt med pasienter med tuberkulose. Hos en BCG-

vaksinert gruppe på 216 personer i Japan uten kjent tuberkuloseeksponering hadde kun 2 % positiv Quantiferon-test, mens 65 % av de 113 som hadde tilgjengelig tuberkulintest, var positive (13). Studier foretatt under utbrudd av tuberkulose på en skole viste at ELISPOT-testen korrelerte bedre enn tuberkulintest (Heaf) med grad av eksponering for tuberkulosesmitte (10). Ved et smitteutbrudd av multiresistent tuberkulose ved en fødeavdeling korrelerte ELISPOT-testen bedre enn tuberkulintest ad modum Mantoux med grad av eksponering. Hos to spedbarn var ELISPOT-testen positiv, men ingen av barna hadde positiv Mantoux-test (14).

Ent problem kan være falskt positive prøver pga. atypiske mykobakterier. En mindre studie påviste positive utslag på RD1-interferon- γ -baserte tester ved infeksjoner med *M. marinum* og *M. kansasii*, men det ble også påvist positive utslag hos friske individer som eide akvarier, eller som hadde yrker som kan medføre utstrakt eksponering for atypiske mykobakterier (veterinærer, blomsterdyrkere) (15). Hvorvidt RD 1-relaterte gener hos atypiske mykobakterier og andre bakterier i naturen kan gi falskt positive prøver, krever nærmere undersøkelser.

Aktiv tuberkulose

Kutan tuberkulintest er ansett som et dårlig diagnostisk hjelpemiddel ved aktiv tuberkulose, fordi sykdommen svekker immunreaksjonen. En på forhånd positiv tuberkulinreaksjon kan under en svær tuberkulose bli negativ («anergi»). I diagnostikken av aktiv tuberkulose vil gullstandarden være påvisning av *M. tuberculosis* ved dyrking.

I enkelte uavklarte tilfeller kan det være vanskelig å oppnå adekvat materiale for dyrking, og nye følsomme tester vil i slike situasjoner kunne være et hjelpemiddel.

I en studie av bakteriologisk verifisert pulmonal og ekstrapulmonal tuberkulose var ELISPOT-testen positiv hos 45 av 47 pasienter, mens tuberkulintesten var positiv hos 18 av 26. Dette gav en sensitivitet av ELISPOT-testen på 96 % mot 69 % for tuberkulintesten. Fire pasienter med miliærtuberkulose, en tilstand der tuberkulintesten oftest er negativ, var alle ELISPOT-positive. De to pasientene med negativ ELISPOT-test hadde uttalt lymfopeni (8). I en annen studie av dyrkingspositive tuberkulosepasienter hadde Quantiferon-testen en sensitivitet på 89 % mot 66 % for Mantoux-testen, og det var ingen sikker svekking av Quantiferon-sensitiviteten med økende alder, noe man hyppig ser ved tuberkulintesten. I gruppen over 70 år hadde således Quantiferon-testen en sensitivitet på 87 % mot 41 % for Mantoux-testen (11). Også hos HIV-positive pasienter med tuberkulose har tuberkulintesten begrenset verdi, med positivt utslag hos 40–60 % (16). I en studie i Zambia var ELISPOT-testen positiv

hos 90 % av HIV-positive tuberkulosepasienter (17). Man må være oppmerksom på at det hos immunkompromitterte kan være så lite interferon- γ -produserende celler at testene får et negativt resultat. En negativ test kan ikke utelukke tuberkulose. Den relative sensitivitet i forhold til nukleinsyreamplifikasjon (PCR) er usikker.

Diagnostikken av barn med tuberkulose kan også by på utfordringer. ELISPOT-testen er i en studie funnet å ha høyere diagnostisk sensitivitet enn tuberkulintesten hos både barn under tre år, barn med HIV-infeksjon og underernærte barn (18).

Konklusjon

De nye blodtestene på tuberkulose synes å ha et potensial for betydelige fremskritt innen tuberkulosedagnostikken. Indikasjonen for testene er både miljøundersøkelser etter utbrudd av smitteførende tuberkulose og diagnostikk ved mistanke om aktiv tuberkuløs sykdom. Det gjenstår å se om de lovende resultatene så langt kan reproduseres i vanlig klinisk praksis. Vi bør erverve oss kunnskaper om de nye testenes praktiske anvendelighet, sensitivitet, spesifisitet og kostnader ved den aktuelle tuberkulosesituasjonen i Norge. Dette kan bety et endelig farvel til kutan tuberkulintesting som rutinemetode og innebære en betydelig forenkling av det forebyggende tuberkulosearbeidet.

Lars Morland

lmorland@online.no
Glittrelinnikken
1488 Hakadal

Amund Gulsvik

Haukeland Universitetssjukehus

Manuskriptet ble godkjent 29.9. 2005.

Oppgitte interessekonflikter: Ingen

Litteratur

1. von Pirquet C, Demonstration zur Tuberkulin-diagnose durch Hautimpfung. *Berl Klin Wschr* 1907; 48: 699.
2. Jentoft HF. Tuberculin reactivity in a young adult Norwegian population. *Lungeforum* 2002; 21 (suppl 21): 1–108.
3. Sørensen AL, Nagai S, Houen G et al. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63: 1710–7.
4. Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I et al. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* 1998; 144: 3195–203.
5. van Pinxteren LA, Ravn P, Agger EM et al. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7: 155–60.
6. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG et al. Evidence for occurrence of the ESAT-6 Protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1996; 64: 16–22.
7. Lewis KN, Liao R, Guinn KM et al. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics *Bacille Calmette-Guérin* attenuation. *J Infect Dis* 2003; 187: 117–23.

8. Lalvani A, Pathan AA, McShane H et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 824–8.
9. Lalvani A, Pathan AA, Durkhan H et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 2001; 357: 2017–21.
10. Ewer K, Deeks J, Alcaez L et al. Comparison of T cell based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *M. tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 2003; 361: 1168–73.
11. Brock I, Weldingh K, Lillebaek T et al. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 65–9.
12. Diagnosing latent tuberculosis infection. Turning glitter to gold. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 5–6.
13. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F et al. Specific detection of tuberculosis infection. An interferon- γ -based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 59–64.
14. Richeldi L, Ewer K, Losi M et al. T cell-based tracking of multidrug resistant tuberculosis infection after brief exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 288–94.
15. Arend SM, van Meijgaarden KE, de Boer K et al. Tuberculin skin testing and in vitro T cell responses to ESAT-6 and culture filtrate protein 10 after infection with *Mycobacterium marinum* or *M. kansasii*. *J Infect Dis* 2002; 186: 1797–1807.
16. Shafer RW, Edlin BR. Tuberculosis in patients infected with human immunodeficiency virus: perspective on the past decade. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 683–704.
17. Chapman AL, Munkata M, Wilkinson KA et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *M. tuberculosis*-specific cells. *AIDS* 2002; 16: 2285–93.
18. Liebeschuetz S, Bamber S, Ewer K et al. Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T-based assay: a prospective cohort study. *Lancet* 2004; 364: 2196–203.