



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Immunodiagnosis of latent tuberculosis : new answers to an old question?

Franken, W.P.J.

Citation

Franken, W. P. J. (2009, June 10). *Immunodiagnosis of latent tuberculosis : new answers to an old question?*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13840>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13840>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

SAMENVATTING

Tuberculose (TB) is een infectieziekte die veroorzaakt wordt door de *Mycobacterium tuberculosis*. De bacterie kan verspreid worden, doordat deze opgehoest wordt door een patient met de besmettelijke variant van de ziekte, long TB. Wanneer de opgehoeste druppeltjes, met daarin de bacterie ingeademd worden door omstanders, kunnen deze de ziekte ook krijgen. Meestal komt na het inademen van de bacterie een goede afweerreactie op gang, waardoor de bacteriën ingesloten worden en niets meer kunnen doen. Deze situatie noemen we latente ziekte (LTBI). De persoon heeft geen klachten, maar draagt de bacterie bij zich. Het gevaar schuilt erin dat als het afweersysteem verslapt, de bacterie weer tot actie kan komen, de persoon alsnog ziek wordt en zelf ook weer nieuwe mensen kan infecteren. Op dit moment wordt geschat, dat een derde van de wereldbevolking latent geïnfecteerd is met TB. Het is dus belangrijk om de latent geïnfecteerde op te sporen en adequaat te behandelen. Daarmee kunnen we nieuwe TB gevallen in de toekomst voorkomen.

De diagnose van LTBI kon tot voor kort alleen gesteld worden door middel van de Mantoux huidtest, ook wel tuberculine huidtest (TST) genoemd. Bij deze test wordt 0,1 ml gedode TB bacterie in de huid gespoten en na 48-72 uur wordt de induratie, verdikking van de huid, gemeten. Wanneer deze meer dan 10 mm is, wordt in het algemeen gesteld, dat de persoon besmet is met tuberculose. Het probleem met de Mantoux huidtest is, dat deze vaak fout positief is, doordat een kruisreactie optreedt na vaccinatie tegen TB of wanneer de persoon besmet is met, in het algemeen, onschadelijke omgevingsmycobacteriën. Toch wordt deze test al meer dan 100 jaar gebruikt. Pas aan het eind van de vorige eeuw kwamen andere testen om LTBI aan te tonen op de markt.

Er werd een regio in het TB genoom ontdekt, dat alleen aanwezig is in de TB bacteriën en afwezig is in de vaccinatie stammen en meeste andere mycobacteriën. Deze regio codeert onder meer een aantal eiwitten, die de bacterie nodig heeft voor het succesvol infecteren van een individu. De meest beschreven eiwitten zijn ESAT-6 en CFP-10. Deze eiwitten worden goed herkend door afweercellen van het lichaam (de zogenaamde T cellen) en mede daarom zijn ze nu toegepast in nieuwe diagnostische testen.

Ten tijde van het promotieonderzoek, beschreven in dit proefschrift, waren er twee commerciële testen op de markt, die ESAT-6 en CFP-10 gebruikten. Een daarvan, de QuantiFERON-TB Gold in-tube (QFT-GIT), is een volbloed test, waarbij bloed

in een buisje wordt afgenomen, waarin de eiwitten al zitten. Nadat deze buisjes 24 uur bij lichaamstemperatuur in een incubator hebben gestaan, kan in het plasma de concentratie bepaald worden van interferon- γ (IFN- γ). IFN- γ wordt door de T cellen van het lichaam gemaakt om de rest van het afweersysteem op de hoogte te brengen van een infectie. Als de T cellen IFN- γ gaan maken, nadat ze geïncubeerd zijn met ESAT-6 en CFP-10, kunnen we zeggen dat deze persoon geïnficeerd is met TB. De andere commerciële test is de T-SPOT. TB. Deze test maakt het aantal cellen, dat IFN- γ maakt na stimulatie met ESAT-6 of CFP-10, zichtbaar. Als er meer cellen IFN- γ maken met stimulatie dan zonder stimulatie, dan kunnen we ook zeggen, dat deze persoon geïnficeerd is met TB. Deze twee testen worden ook wel interferon- γ release assays (IGRA) genoemd, omdat ze het vrijgekomen IFN- γ meten.

In Nederland kunnen we stellen, dat er twee verschillende situaties zijn, als we spreken over het beteugelen van de latente vorm van TB. Aan de ene kant zijn er autochtone Nederlanders, ongevaccineerd en met een lage prevalentie van TB. LTBI is in deze doelgroep aan te tonen door middel van de TST en bij een positief resultaat wordt meestal zes maanden profylactische medicatie gestart. Aan de andere kant zijn er immigranten, die uit landen komen waar veel TB is. Die zijn ook bijna allemaal gevaccineerd tegen TB en hebben ook in Nederland een groter risico om TB op te lopen. Aangezien de TST bij deze personen vaak fout positief is, door vaccinatie, door infectie met omgevingsbacteriën of positief door een oude infectie, is deze test niet bruikbaar. De consequentie hiervan is, dat deze personen ook niet behandeld worden voor LTBI. Vanwege de grote verschillen zullen deze twee groepen apart besproken worden in dit proefschrift. Verder wordt ook de toekomst van de tuberculose diagnostiek en een vergelijking van het afweersysteem van behandelde TB patiënten en LTBI beschreven.

In de studie beschreven in **hoofdstuk 2** is de QFT-GIT geëvalueerd in niet-gevaccineerde werknemers van het ministerie van Defensie. Uit deze analyse bleek, dat er veel foutpositieve TST reacties gevonden worden, wanneer de militairen terugkomen van missie naar een land, waar veel TB voorkomt. Dit hebben we laten zien doordat de QFT-GIT, een test die specifiek geacht wordt voor het vaststellen van LTBI, slechts bij een klein percentage van de positieve huidtesten na missie ook positief was. Bij de rekruten, die nog geen blootstelling hebben gehad aan TB en waarschijnlijk ook niet aan omgevingsmycobacteriën, was het percentage positieve QFT-GIT uitslagen bij een positieve huidtest veel hoger. Wij denken dat dit mogelijk wordt veroorzaakt doordat de militairen tijdens hun missie besmet zijn met omgevingsmycobacteriën. Al in 1995 heeft Bruins et

al. met een speciale huidtest laten zien, dat waarschijnlijk 50% van de positieve huidtesten na missie kwam door een infectie met de omgevingsmycobacteriën. Om er nu echter zeker van te zijn, dat de personen met een negatief QFT-GIT resultaat en positieve huidtest, inderdaad niet besmet zijn met TB, zouden deze personen de rest van hun leven gevolgd moeten worden om te bezien of ze zelf geen TB ontwikkelen.

Hoofdstuk 3, 4 en 5 beschrijven drie studies rondom een grootschalig contact onderzoek in Zeist, naar aanleiding van een besmettelijke supermarkt medewerker. Uit de studie in **hoofdstuk 3** is duidelijk geworden, dat de QFT-GIT en de T-SPOT.TB, een duidelijke correlatie hebben met de mate van blootstelling aan een besmettelijke TB patiënt. Dit is uitgezocht aan de hand van het winkelgedrag van de deelnemers. Het bleek dat mensen, die cumulatief meer tijd doorgebracht hadden in de supermarkt, waar de besmettelijke patiënt werkte, vaker een positieve IGRA uitslag hadden dan mensen, die maar weinig tijd in de supermarkt hadden doorgebracht. Deze relatie werd niet gevonden voor de huidtest.

In **hoofdstuk 4** zijn de resultaten van de studie beschreven, waarin de personen, met een positieve TST in het contactonderzoek (van hoofdstuk 3), twee jaar lang gevolgd zijn ter behandeling of controle voor TB. Tijdens deze periode zijn ieder half jaar beide IGRA herhaald, om te analyseren of de uitslag van deze testen negatief zou worden na of tijdens de behandeling voor LTBI. Uit de resultaten is gebleken, dat de uitslag van de IGRA nagenoeg hetzelfde bleef gedurende de twee jaar. De personen met een lage IGRA uitslag bleven negatief en die met een hele hoge uitslag bleven positief. Wel bleek dat mensen, die een gemiddeld hoge uitslag hadden, meer dynamiek vertoonden. In deze groep wilde de uitslag van de IGRA ook nog wel eens veranderen. Wat dit precies betekend is nog niet duidelijk. Het kan zijn dat dit aan de testen zelf ligt, of dat het een weerspiegeling is van een continue strijd tussen afweersysteem en bacterie. Geen van de deelnemers aan de studie heeft gedurende de twee jaar zelf TB ontwikkeld. Dit betekent, dat in de toekomst eenzelfde, prospectieve studie uitgevoerd zou moeten worden in een groep personen, die recent besmet is en dat dan bekeken moet worden welke personen zelf TB ontwikkelen en of dat gecorreleerd is aan de uitslag van de IGRA. In de literatuur over de IGRA zijn nog maar weinig studies beschreven, die hiernaar gekeken hebben en hun conclusies zijn ook niet eenduidig.

In **hoofdstuk 5** zijn de IGRA en de huidtest herhaald bij personen, die ten tijde van het contactonderzoek beschreven in hoofdstuk 3, een positieve IGRA uitslag hadden en een negatief huidtest resultaat. Dit was onverwacht, aangezien het nog niet eerder beschreven was, dat de IGRA sensitiever zouden zijn voor LTBI dan de huidtest. Andersom, een negatieve IGRA en een positieve huidtest, kunnen

we goed verklaren, doordat de TST dan geacht wordt fout positief te zijn door kruisreactiviteit met omgevingsmycobacteriën of vaccinatie tegen TB. Toen de IGRA en de huidtest een jaar later herhaald werden, bleek dat bijna de helft van de personen nu wel een positieve huidtest had, terwijl de IGRA uitslagen nu negatief waren. Een mogelijk verklaring voor deze observatie is, dat deze personen besmet zijn geweest met erg weinig bacteriën, gevolgd door een sterke, afdoende immuun reactie. Dat zegt dus eigenlijk dat deze personen een klinisch niet-relevante infectie hebben doorlopen.

In **hoofdstuk 6** laten we aan de hand van de data van een prospectieve studie onder immigranten in Nederland zien, dat oude blootstelling wel degelijk een sterke relatie heeft met een positieve IGRA uitslag. Deze bevinding is belangrijk, omdat we aan het begin van dit promotieonderzoek dachten, dat juist de immigranten uit landen met veel TB, die ook nog eens gevaccineerd zijn tegen TB, het meeste baat zouden hebben bij een IGRA test, om een recente latente besmetting op te sporen. Uit deze studie blijkt echter, dat beide IGRA testen wel oude LTBI infecties oppikken en dat ze dus maar een kleine toegevoegde waarde zullen hebben ten opzichte van de TST in deze groep.

De studie beschreven in **hoofdstuk 7** is het vervolg op hoofdstuk 6. De immigranten, die aan deze studie meededen, waren kort daarvoor in contact geweest met een besmettelijke TB patiënt en dus mogelijk latent besmet met TB. Maar aangezien we bij deze personen niet kunnen vast stellen of ze latent besmet zijn, kunnen we hen ook niet adequaat handelen door ze een profylactische behandeling voor te schrijven. Daarom hebben we in deze studie onderzocht, wat de voorspellende waarde voor het ontwikkelen van actieve ziekte is van de huidtest en beide IGRA. De resultaten van de studie laten zien, dat de IGRA niet beter presteren dan de TST. Van de 8 patiënten, die actieve TB hebben ontwikkeld, hadden er twee een negatieve T-SPOT.TB en 3 een negatieve QFT-GIT uitslag. Een mogelijke reden hiervoor kan zijn, dat de IGRA te snel na besmetting zijn uitgevoerd en dat de testen niet genoeg tijd hebben gehad om positief te worden. Beide fabrikanten claimen ook niet dat de testen 100% sensitief zijn en aangezien we meer dan 300 personen hebben geïncubeerd, is het goed mogelijk dat we een aantal geïnfecteerde personen hebben gemist. Omdat er nog maar een paar onderzoekers zijn, die onbehandeld LTBI personen hebben gevolgd, is er meer onderzoek nodig om deze resultaten te bevestigen.

In hoofdstuk 8 en hoofdstuk 9 zijn meer de technische aspecten van beide IGRA geanalyseerd.

In **hoofdstuk 8** staan de resultaten beschreven van een vergelijkend onderzoek naar de interpretatie van de T-SPOT.TB test door verschillende, onafhankelijke personen. Het bleek, dat elke aflezer zijn of haar eigen interne standaard heeft om te bepalen wat wel en wat geen spotje is. De uitslagen waren per individu dan ook zeer constant. Een verontrustende bevinding was echter, dat er een verschil van 15% in positieve uitslagen zat tussen de hoogste en de laagste aflezer. Daarvan zaten er echter vijf van de zes binnen de 6%. Er is nog niet eerder onderzoek gedaan naar het interpreteren van deze test en deze studie heeft laten zien dat het belangrijk is om deze evaluatie alsnog uit te voeren.

In **hoofdstuk 9** is aangetoond dat de kwantitatieve uitslagen van de QFT-GIT boven de 10 IU/ml niet interpreteerbaar zijn. Mogelijke oorzaken hiervoor zijn het prozone effect en de beperkte reikwijdte van de standaarden. Kwantitatieve uitslagen boven de 10 IU/ml zouden dan ook weergegeven moeten worden als meer dan 10 IU/ml en niet verder gespecificeerd. Voor de test op zich heeft dit geen gevolgen, aangezien een test al positief wordt bevonden wanneer deze 0.35 IU/ml is. De standaardreeks loopt van 0 tot 4 IU/ml en deze waarde is dus nauwkeurig te bepalen.

Hoofdstuk 10 behandelt een meer basale vraagstelling, namelijk: Zijn er verschillen in de afweerreactie tussen latent geïnficeerde en genezen TB patiënten? Uit dit onderzoek blijkt, dat er wel degelijk kwantitatieve en kwalitatieve verschillen zijn. Wanneer de witte bloedcellen van genezen TB patiënten gestimuleerd worden met eiwitten van de TB bacterie, ontwikkelen zich multifunctionele cellen. Naast IFN- γ produceren deze cellen tegelijkertijd ook 2 andere cytokines, namelijk IL-2 en TNF- α . De cellen van latente personen deden dit niet. Zij maakten alleen IFN- γ . Verder bleek, dat de cellen van de TB patiënten, die de cytokines produceerden, verschillend waren van de cellen van de latent geïnficeerden. De TB patiënten hadden meer effector-memory cellen, die heel effectief zijn in het opruimen van een infectie. De latent geïnficeerden hadden voornamelijk cellen met een naïef uiterlijk, die nog niet geleerd hebben, hoe ze het beste een infectie kunnen bestrijden. Andere studies hebben laten zien, dat we in plaats van IFN- γ , misschien beter een ander cytokine kunnen meten, namelijk IP-10. Dit stofje, ook geproduceerd door de afweercellen van het lichaam, zou namelijk gevoeliger zijn om een infectie mee aan te tonen. Uit ons onderzoek bleek ook, dat de latent geïnficeerden wel IP-10 maakten, terwijl we geen IFN- γ konden meten. Meer onderzoek is nodig om de verschillen in de afweer reacties van oud TB patiënten en laten geïnficeerden in kaart te brengen, opdat we wellicht kunnen gaan begrijpen, waarom de ene persoon wel en de andere geen actieve TB ziekte ontwikkelt.

De toekomst van de TB diagnostiek hoeft zich niet binnen de IGRA te bevinden. In **hoofdstuk 11** wordt een studie beschreven, waarin een nieuwe huidtest werd geëvalueerd. Deze huidtest maakte gebruik van ESAT-6 in plaats van PPD als reactiestof en zou dus alleen verdikking van de huid (induratie) moeten veroorzaken als de geïnjecteerde persoon besmet was met tuberculose. Deze studie was een fase-I studie. Dat betekent, dat onderzocht werd of het middel veilig is voor gebruik in mensen. Uit de studie bleek dat ESAT-6 veilig gebruikt kan worden. De gezonde vrijwilligers, die meegedaan hadden, hadden geen last van bijwerkingen. Verder bleek dat, toen het ESAT-6 ingespoten werd bij behandelde TB patiënten, zij allemaal een sterke reactie, gelijkwaardig aan TST, hadden. Dit betekent, dat een huidtest met ESAT-6 in de toekomst wellicht gebruikt kan worden. Alvorens hiertoe over te gaan moet eerst nog uitgebreider onderzoek gedaan worden in grotere groepen.

Tot slot, de studies, die beschreven staan in dit proefschrift, hebben laten zien dat de nieuwe bloedtesten om latente TB aan te tonen, zeker een toegevoegde waarde hebben binnen de diagnostiek van TB. Echter, net zoals elke andere test hebben beide bloedtesten ook hun beperkingen. Dit betekent, dat niet uitsluitend afgegaan moet worden op de resultaten van de bloedtesten, maar dat deze betrokken moeten worden bij alle andere klinische gegevens.