©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Mitt. Österr. Ges.
Tropenmed. Parasitol. 19 (1997)
113 - 124

Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand
(Dean: Prof. Tan Chongsuphajaisiddhi) (1)

Department of Medicine, Maharaj Hospital, Nakhon Ratchasima, Thailand (2)

Royal Thai Army Component, Armed Forces Research Institute of Medical Science,
Bangkok (AFRIMS), Thailand (3)

Department of Medicine, AFRIMS, Bangkok, Thailand (4)

Evaluation eines neu entwickelten Dipstick-Tests zur Schnelldiagnose des Tsutsugamushi-Fiebers

H. Laferl[1], F. Chappuis[1], K. Akkhavong[1], S. Looareesuwan[1], P. Wilairatana[1], C. Viravan[1], V. Wangsuphachart[1], S. Chinprasatsak[2], C. Eamsila[3] and G. Watt[4]

Einleitung

Das Tsutsugamushi-Fieber, hervorgerufen durch *Rickettsia tsutsugamushi*, ist eine durch den Biss von Milbenlarven auf den Menschen übertragbare Zoonose. Es stellt eine häufige Ursache fieberhafter Erkrankungen in vielen ruralen Gebieten Südost- und Ostasiens dar und befällt sowohl die lokal ansässige Bevölkerung als auch Reisende (21), die sich im Dschungel, in Sekundärwäldern und Gestrüpp, aber auch in Reisfeldern aufhalten. Das Tsutsugamushi-Fieber war eine von den Militärs im 2. Weltkrieg und auch im Vietnamkrieg gefürchtete Erkrankung und für eine beträchtliche Morbidität und Mortalität unter den Soldaten verantwortlich (1, 2, 6, 12, 15).

In Thailand war bis 1993, mit 1367 Erkrankten, ein stetiger Anstieg der, den Gesundheitsbehörden gemeldeten Fälle zu verzeichnen; in den Jahren 1994 und 1995 waren es dann jeweils ca. 1100. Das Tsutsugamushi-Fieber tritt vorwiegend in der Regenzeit von Juni bis Oktober auf (10, 11).

Das klinische Bild des Tsutsugamushi-Fiebers ist, in Abwesenheit der nahezu pathognomonischen Primärläsion („eschar"), nur sehr schwer von dem anderer, in diesen Gebieten vorkommenden fieberhaften Erkrankungen wie Malaria, Typhus, Leptospirose oder Denguefieber zu unterscheiden. Leider tritt diese „eschar", im Gegensatz zu erkrankten Touristen oder ortsfremden Soldaten, nur bei einer Minorität der autochthonen asiatischen Patienten auf, und wird zudem bei der physikalischen Krankenuntersuchung aufgrund ihrer Lokalisation in eher schwierig zu untersuchenden Körperregionen nicht selten übersehen (2, 23). Der typische Ausschlag, ein weiteres potentielles Merkmal, um die Diagnose klinisch zu stellen, findet sich ebenfalls bei Asiaten in einem weitaus geringeren Prozentsatz als bei Patienten kaukasischer Herkunft (2, 12, 15).

Die klinische Diagnose des Tsutsugamushi-Fiebers kann serologisch gesichert werden, wobei der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) sowie der indirekte Immunperoxidasetest (IIP) als Methoden der Wahl anzusehen sind. Weiters besteht die Möglichkeit, das kausative Agens *R. tsutsugamushi* im Tierversuch durch Mäuseinokulation zu isolieren. Seit kurzem ist auch der Nachweis mittels PCR möglich (4, 9, 18). Die eben genannten Techniken sind allerdings teuer, erfordern ein Referenzlabor mit entsprechend personeller und technischer Ausstattung und sind generell in diesen Gebieten, wo das Tsutsugamushi-Fieber hauptsächlich vorkommt, nicht vorhanden. Der seit

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

dem 1. Weltkrieg bekannte Weil-Felix-Test stellt somit meist den einzig verfügbaren Bestätigungstest dar und wird auch in großem Ausmaß eingesetzt, ist aber aufgrund seiner inakzeptabel niedrigen Sensitivität und Spezifität als obsolet zu betrachten (4, 18).

Das Fehlen eines im klinischen Alltag geeigneten Diagnostikums, verbunden mit der oft unspezifischen Symptomatik und dem breiten Spektrum des Schweregrades der Erkrankung führen dazu, daß das Tsutsugamushi-Fieber nicht selten übersehen wird. Dies zeigt sich auch in der Diskrepanz zwischen den hohen Seroprävalenzraten und den relativ wenigen gemeldeten Fällen, sowohl in Thailand als auch in den anderen Staaten Südostasiens (3, 8, 17, 19).

Die kürzlich erfolgte Beschreibung von *R. tsutsugamushi*-Stämmen, welche offensichtlich resistent gegen die beiden Standardantibiotika, Doxycyclin und Chloramphenicol, sind, verstärkt noch das Problem des Klinikers, keinen brauchbaren Test zur Hand zu haben, diese endemisch auftretende und potentiell fatale Infektion rechtzeitig zu diagnostizieren (20).

Ein kürzlich entwickelter Dipstick-Test zeigte in einer Studie eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 83% verglichen mit dem IFT. Der prädiktive Wert eines negativen Testergebnisses betrug, bei einer angenommenen Prävalenz von 20%, hervorragende 97% (22).

Ziel unserer Studie war es, diesen neu verfügbaren Dipstick-Test hinsichtlich Sensitivität, Spezifität, prädiktiven Werts sowie Praktikabilität im klinischen Alltag eines Schwerpunktkrankenhauses in einem Endemiegebiet zu bewerten.

In der Zeit vom 13. November 1995 bis 5. Jänner 1996 wurde der Dipstick-Test bei allen Erwachsenen, die wegen einer akut fieberhaften Erkrankung die Abteilung für innere Medizin im Maharaj Hospital aufsuchten, angewendet und die Ergebnisse mit denen des IIP-Tests verglichen.

Material und Methoden

Studienort und Studiendesign

Diese klinisch-diagnostische Studie wurde am Maharaj Hospital, einem Schwerpunktkrankenhaus mit 1000 Betten, in Nakhon Ratchasima, Hauptstadt der gleichnamigen, bevölkerungsmäßig zweitgrößten Provinz Thailands, durchgeführt.

Patienten

Alle mehr als 14 Jahre alten Patienten, die wegen einer akut fieberhaften Erkrankung (orale Temperatur ≥37,8°C) entweder die medizinische Ambulanz aufsuchten oder im Zuge der zweimal täglich abgehaltenen Visiten gesehen wurden, wurden für die Studie rekrutiert. Patienten, bei denen nach Erhebung einer sorgfältigen Anamnese und genauen physikalischen Untersuchung eine offensichtlich andere Diagnose als Tsutsugamushi-Fieber vorlag, wurden von der Studie ausgeschlossen.

Allen Studienpatienten wurde Blut abgenommen und umgehend ein Dipstick-Test von den Studienärzten gemacht. Entsprechend dem Testresultat („positv" oder „negativ") wurden die Patienten in 3 Gruppen unterteilt:

Gruppe A — Patienten mit einem positiven Dipstick-Test.

Gruppe B — Patienten mit einem negativen Dipstick-Test, deren klinisches Zustandsbild eine stationäre Aufnahme erforderte.

Gruppe C — Patienten mit einem negativen Dipstick-Test und milder klinischer Symptomatik, die keiner stationären Behandlung bedurften. Aufgrund limitierter finanzieller Resourcen wurde beschlossen, nur bei einer randomisierten Subgruppe der Gruppe C IIP-Tests durchzuführen. IIP-Tests wurden somit nur bei der Gruppe C1, nicht aber bei der Gruppe C2 gemacht.

Bei allen stationär aufgenommenen Patienten wurden mindestens einmal täglich die Symptome sowie ein physikalischer Status erhoben, und die Ergebnisse auf standardisierten Studienprotokollblättern erfaßt.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Der in dieser Studie verwendete Dipstick-Test ist unter dem Markennamen Dip-S-Ticks® *R. tsutsugamushi* (Integrated Diagnostics, Inc., Baltimore, MD 21227, U.S.A.) kommerziell erwerbbar. Der Test wurde entsprechend den Anleitungen des Erzeugers durchgeführt und sei hier in Kürze beschrieben: das Testkit beinhaltet 4 Reagenzflüssigkeiten, 4 Reaktionsküvetten pro Test sowie 10 oder 50 Teststreifen aus Nitrozellulose; destilliertes Wasser sowie Wasserbad sind nicht darin enthalten. Jeder Teststreifen hat auf seiner Nitrozellulosemembran an 6 Stellen in den Fenstern der Plastikmaske die Antigene in folgender Anordnung aufgetragen: humanes IgG Antigen als Positivkontrolle, Verdünnerflüssigkeit als Negativkontrolle, *R. tsutsugamishi* Antigen vom Karp Stamm (1 mg Protein/ml) in einer Verdünnung von 1:400, 1:1600 und 1:6400 sowie *R. tsutsugamushi* Antigen vom Serotyp Kato und Gilliam im Verhältnis 1:1 in einer Verdünnung von 1:400. Die Reagenzien umfassen einen Probenverdünner, einen Verstärker (zur Entfernung nicht oder nur schwach gebundener Proteine), eine Konjugationsflüssigkeit, bestehend aus an alkalische Phosphatase konjugierte Ziegen-Antikörper gegen humanes IgG und IgM und einen Entwickler (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat und p-Nitroblautetrazoliumchlorid). Zur Durchführung des Tests werden nun 4 Reaktionsküvetten beschriftet, in das Wasserbad mit 50°C eingebracht und mit jeweils 2 ml des passenden Reagens gefüllt. Die Serumprobe (0,01 ml) wird mittels Pipette in die Reaktionsküvette Nr. 1 (Verdünner) eingebracht und dann 10 Minuten gewartet. In der Zwischenzeit wird der Teststreifen in ein mit 50 ml destilliertem Wasser gefüllten Gefäß für mindestens 4 Minuten eingetaucht. Der Teststreifen wird dann in die Reaktionsküvette Nr. 1 gestellt und dort für 5 Minuten belassen, danach einige Sekunden in destilliertem Wasser gewaschen und für weitere 5 Minuten in der Reaktionsküvette Nr. 2 inkubiert, wiederum gewaschen und in der Küvette Nr. 3 für 10 Minuten inkubiert. Auf einen weiteren Waschvorgang folgend, wird der Teststreifen für 5 Minuten im destilliertem Wasser stehen gelassen und schlußendlich wiederum 5 Minuten in Küvette Nr. 4 inkubiert, noch ein abschließendes Mal gewaschen, luftgetrocknet und abgelesen. Ein positives Testergebnis liegt vor, wenn in den entsprechenden Fenstern mit *R. tsutsugamushi* Antigen mit freiem Auge — bei gutem Tageslicht — ein scharf begrenzter, violetter Fleck („dot") zu sehen ist; ein solcher Fleck muß auch im Fenster der Positivkontrolle erkennbar sein, jenes der Negativkontrolle muß weiß erscheinen.

Der Dipstick-Test wurde von den 3 Studienärzten selbstständig im mikrobiologischen Labor des Spitals umgehend nach der Blutabnahme durchgeführt. Die Resultate wurden sowohl von den Studienärzten unmittelbar nach erfolgtem Test mit „positiv" oder „negativ" bewertet, als auch alle 2 Wochen von einem Experten beurteilt.

Indirekter Immunperoxidase-Test (IIP)

Sera für den IIP wurden bei allen Gruppen (A, B und C1) am Tag 0 gewonnen. Eine zweite Serumprobe folgte bei den Gruppe A- und B-Patienten, üblicherweise am Tag vor der Entlassung. Alle Sera wurden bei −70°C bis zur Durchführung der IIP im AFRIMS in Bangkok gelagert. IIP-Titer ≤1:50 galten als negativ.

Routinelaboruntersuchungen

Komplettes Blutbild, Leber- und Nierenfunktionsparameter, Serumelektrolyte, Blutkultur, dicker Tropfen zur Malariadiagnostik, HIV-Serologie, EKG und Lungenröntgen wurden bei allen stationären Patienten gemacht. Ein Weil-Felix-Test war für Tag 0 und Tag14 geplant.

Diagnosekriterien

Die Diagnose Tsutsugamushi-Fieber wurde als gesichert betrachtet, wenn ein akut fieberhafter Zustand unklarer Ätiologie sowie ein oder mehrere der folgenden Kriterien vorlag:

1. Typische Primärläsion („eschar").
2. Akuter Serumtiter von IgM ≥1:400 und/oder IgG ≥1:1600 in der IIP.
3. Vierfacher oder größerer Titeranstieg auf zumindest 1:200 in der IIP.

Datenverarbeitung

Datensammlung und -analyse erfolgten mit EPI INFO 6 und Microsoft Excel 5 for Windows auf einem IBM-kompatiblen PC. Sensitivität und Spezifität wurden mittels Vierfeldertafeln berechnet, prädiktiver Wert eines positiven (PVP) bzw. negativen (PVN) Testergebnisses mittels Bayes' Theorem und folgender Formel:

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

PVP = Sens. × Präv. / Sens. × Präv. + [1 - Spez.] × [1 - Präv.]

PVN = Spez. × [1 - Präv.] / Spez. × [1 - Präv.] + [1 - Sens.] × Präv.

Die Mittelwerte kontinuierlicher Daten wurden mittels Student's t-Test verglichen. Der χ^2-Test oder, wenn angezeigt, Fisher's Exact Test wurden zum Vergleich kategorischer Daten herangezogen. Die Signifikanzgrenze wurde mit $p < 0.005$ festgelegt.

Ergebnisse

Dipstick-Test

Der Dipstick-Test wurde bei 100 Patienten, die die Einschlußkriterien erfüllten, angewendet und war bei 29 positiv und 71 negativ. Entsprechend dem Testergebnis sowie dem Schweregrad des klinischen Bildes konnten diese 100 Patienten wie folgt eingeteilt werden: 29 in Gruppe A, 39 in B, 15 in C1 und 17 in Gruppe C2. Da in letztgenannter Patientengruppe keinerlei Bestätigungstest möglich war, wurden diese Patienten von der Studie exkludiert, und es verblieben 83 zur weiteren Evaluation. Unter Anwendung der zuvor genannten Kriterien wurde bei 30 Patienten ein Tsutsugamushi-Fieber diagnostiziert (Tab. 1).

Sechsundzwanzig dieser 30 Tsutsugamushi-Fieber Fälle hatten einen positiven Dipstick-Test, 4 einen negativen. Zwei dieser 4 Patienten mit einem offensichtlich falsch-negativen Dipstick-Test hatten sich mit einem für ein Tsutsugamushi-Fieber durchaus typischen Krankheitsbild präsentiert und hatten hohe, diagnostische IIP-Titer von IgM (1:3200), IgG (1:400) bzw. IgM plus IgG (1:3200). Der Dipstick-Test wurde in beiden Fällen, unter Verwendung der identischen Originalsera, im AFRIMS wiederholt, und erbrachte ein klar positives Resultat. Bei den anderen 2 Patienten mit falsch-negativem Test wurde zusätzlich eine *P. falciparum*-Malaria diagnostiziert. Einer der beiden hatte in der Akutserumprobe Werte von IgM ≤1:50 und IgG 1:400, und zeigte innerhalb von 3 Tagen einen signifikanten Titeranstieg auf IgM 1:400 und IgG 1:1600, und auch der andere serokonvertierte, sein IgM-Titer stieg von ≤1:50 am Tag 0 auf 1:800 am Tag 3.

Bei 3 Patienten mit einem positiven Dipstick-Test ließ sich die Vermutungsdiagnose Tsutsugamushi-Fieber nicht bestätigen, sie waren als falsch-positiv zu werten. Bei 2 von ihnen konnte eine Alternativdiagnose gestellt werden. Eine Patientin hatte eine akute Pyelonephritis *(E. coli)*, ihre Antikörpertiter gegen *R. tsutsugamushi* im IIP-Test betrugen für IgM ≤1:50 und IgG 1:400 am Tag 0 und Ig ≤1:50 und IgG 1:800 am Tag 11. Beim anderen wurde eine Meningitis tuberculosa diagnostiziert, seine IIP-Titer waren für IgM 1:200 und IgG 1:800 an den Tagen 0 und 9; es fand also keine Titerbewegung statt. Der dritte Patient mit einem falsch-positiven Dipstick-Test fieberte spontan innerhalb von 48 Stunden ab und wurde ohne definitive Diagnose entlassen. Sein IgM-Titer betrug ≤1:50 an Tagen 0 und 3, der IgG-Titer war initial 1:100 und zeigte keine Dynamik. Eine Vierfeldertafel (Tab. 2) faßt die Resultate des Dipstick-Tests zusammen.

Die Sensitivität und Spezifität des Dipstick-Tests, berechnet anhand der Daten in Tabelle 2, war somit 87% bzw. 94%. Die Prävalenz des Tsutsugamushi-Fiebers unter Patienten mit akutem FUO (fever of unknown origin) betrug 36% in dieser Studie, woraus sich ein positiver prädiktiver Wert von 89,5% und ein negativer prädiktiver Wert von 92.5% ableiteten läßt (Abb. 1).

Klinische Merkmale

Basischarakteristika, Symptome und physikalische Befunde der 30 Patienten mit Tsutsugamushi-Fieber sowie der Gruppe von 53 Patienten mit einem fieberhaften Zustandsbild anderer Ätiologie sind in Tabelle 3 und 4 dargestellt.

Eine Primärläsion („eschar") fand sich bei 13 der 30 Tsutsugamushi-Fieber Patienten (43%) an folgenden Körperstellen: Leistenbeuge 4, Abdomen 2, Skrotum 2, Penis 1, Nacken 1, Axilla 1, Oberarm 1 und eine am Oberschenkel.

Laborbefunde der 30 Tsutsugamushi-Fieber Patienten

Der Medianwert der Leukozyten betrug 11.000/mm^3 (5.000-20.200); 16 (53%) zeigten eine Leukozytose, keiner eine Leukopenie. Thrombozytopenien mit Werten <100.000/mm^3 wurden bei 3 Patienten beobachtet, alle 3 hatten zusätzlich eine *P. falciparum*-Malaria. SGOT und SGPT waren bei 76% bzw. 88% erhöht, bei 33% auf mehr als das Dreifache. Geringfügig erhöhte Bilirubinwerte sah

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 1:

Kriterien zur Diagnose des Tsutsugamushi-Fiebers.

Kriterium	Anzahl (%) der Patienten
Eschar plus hoher IIP-Titer*	13 (43)
Hoher IIP-Titer allein*	12 (40)
4-facher IIP-Titeranstieg**	5 (17)
Total	30 (100)

* IgM: ≥1:400 und/oder IgG: ≥1:1600
** auf einen Titer ≥ 1:200

Tabelle 2:

Vergleiche zwischen Dipstick-Test und Immunperoxydase-Test (IIP).

	IIP positiv	IIP negativ	Total
Dipstick-Test pos.	26	3	29
Dipstick-Test neg.	4	50	54
Totals	30	53	83

Tabelle 3:

Basis-Charakteristika von 30 Patienten mit Tsutsugamushi-Fieber und 53 Patienten mit einer fieberhaften Erkrankung anderer Ätiologie.

Charakteristikum: Wert ausgedrückt in	Tsutsugamushi-Fieber	Non Tsutsugmushi-Fieber	p-Wert
Alter (a): Mittelwert ± SD	42,4 ± 15,9	41 ± 16,2	NS
Geschlecht: Anzahl männl./weibl.	20/10	33/20	NS
Bauern: %	73	45	0,013
Reisfeldarbeit: %	77	46	0,007
Waldarbeit: %	53	35	NS
anamnest. Milbenbiss: %	23	4	0,011
Fiebertage vor Aufnahme in Studie:	6	5	
Median (Bereich)	(1 - 30)	(1 - 90)	NS
Todesfälle: %	0	8*	NS

* Todesursache: AIDS mit Kryptokokkenmeningitis (1), Pneumonie (1), Sepsis (1), susp. Leptospirose (1).

man in 25% der Fälle, Ikterus mit einem Bilirubin von 6,3 mg/ml allerdings nur bei einer Patientin. Während bei 70% eine Proteinurie festgestellt wurde, war das Serumkreatinin bei allen Patienten im Normbereich.

Serologische Untersuchungen

Die IIP-Antikörpertiter gegen *R. tsutsugamushi* am Tag 0 sind in Tabelle 5 dargestellt. Fünf Patienten entwickelten einen zumindest vierfachen Titeranstieg während des Krankheitsverlaufs; hier ist allerdings anzumerken, daß bei den Patienten der Gruppe C1 nur Akutserumproben vorhanden waren, und auch bei jenen Patienten, deren IIP-Titer in der Akutserumprobe bereits über dem gewählten Cut-off-Titer von IgM ≥1:400 und/oder IgG ≥1:1600 lagen, kein IIP-Test der Rekonvaleszentenzsera erfolgte.

Ein Weil-Felix-Test wurde bei 22 Akutserumproben gemacht, und zeigte nur bei 2 einen signifikanten OX-K Titer von ≥1:160, resultierend in einer Sensitivität von 9%. In 7 Fällen wurde der Weil-Felix-Test an gepaarten Sera durchgeführt, in keinem davon konnte ein zumindest vierfacher Titeranstieg beobachtet werden.

Pulmonale, zentralnervöse und kardiale Manifestationen

Neun der 30 Tsutsugamushi-Fieber-Fälle (31%) hatten Zeichen einer interstitiellen Pneumonie im Lungenröntgen, aber nur 2 zeigten klinisch eine respiratorische Insuffizienz (7%). ZNS-Symptome fanden sich bei 2 anderen Patienten. Beide waren nackensteif, einer zudem somnolent und ausgeprägt apathisch im weiteren Krankheitsverlauf. Die Lumbalpunktion brachte einen klaren Liquor ohne Pleozytose und nur leicht erhöhter Proteinkonzentration zutage, im anderen Fall war eine Pleozytose von 20 Lymphozyten/mm^3 bei normalen Glukose- und Proteinwerten nachzuweisen. Geringfügige EKG-Veränderungen wurden bei 7 Patienten festgestellt; 6 davon hatten negative T-Wellen, und einer transientes Vorhofflimmern.

Therapie

Einundzwanzig Patienten erhielten Doxycyclin p. o., 1 Chloramphenicol p. o., 3 Chloramphenicol i. v. plus Doxycyclin p. o., 2 Tetrazykline p. o. im Rahmen eines Therapieregimes bei *P. falciparum*-Malaria, und eine Patientin bekam Clarithromycin p. o. Ein Gruppe-A-Patient mit begleitender *P. falciparum*-Malaria und ein Patient der Gruppe C1, bei denen das Tsutsugamushi-Fieber erst retrospektiv diagnostiziert wurde, erhielten keine adäquate antibiotische Therapie. Die mediane Abfieberungszeit betrug bei jenen 20 Patienten, bei denen suffiziente Daten diesbezüglich vorhanden waren, 60 Stunden (24-90 Stunden).

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

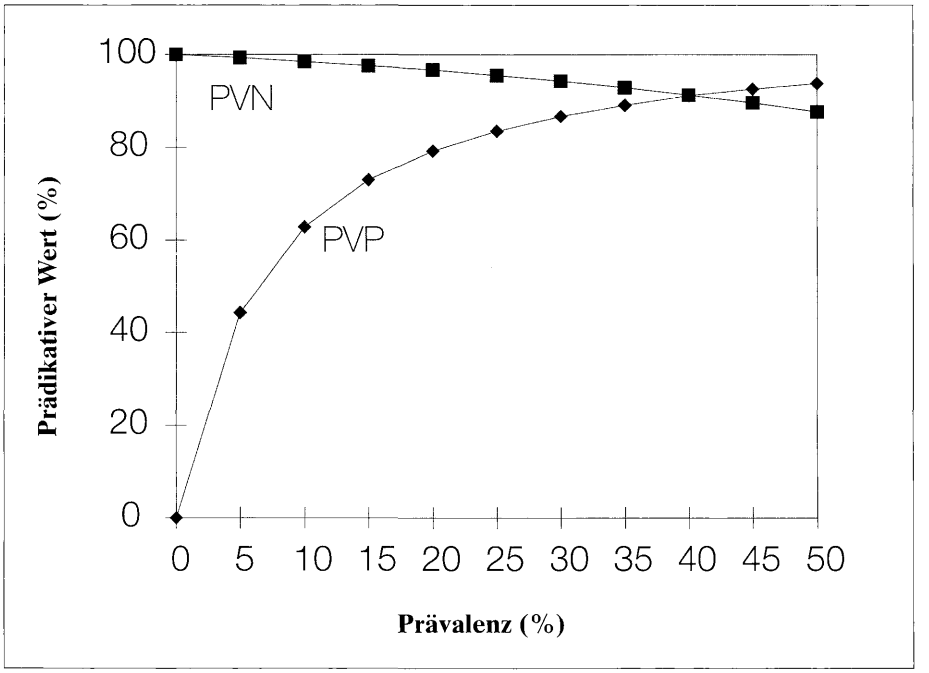

Abbildung 1:

Prädiktiver Wert des Dipstick-Testergebnisses in Abhängigkeit von der Prävalenz des Tsutsugamushi-Fiebers unter Patienten mit akutem FUO.

Tabelle 4:
Symptome und physikalischer Befund von 30 Patienten mit Tsutsugamushi-Fieber und 53 Patienten mit fieberhafter Erkrankung anderer Ätiologie.

Charakteristikum: ausgedrückt in	Tsutsugamushi-Fieber	Non-Tsutsugamushi-Fieber	p-Wert
Symptom: %			
Fieber *	100	100	NS
Zephalea	93	77	NS
Schüttelfrost	97	75	0,012
Myalgien	73	48	0,025
Arthralgien	73	51	NS
Kreuzschmerzen	90	65	0,013
Halsschmerzen	47	24	NS
Husten	40	29	NS
Übelkeit	43	43	NS
Erbrechen	33	37	NS
Durchfall	7	13	NS
Hörverschlechterung	37	18	NS
Physikalischer Befund: %			
Primärläsion (Eschar)	43	0	<0,001
Ausschlag	3	6	NS
Lymphadenopathie	80	28	<0,001
Konjunktivale Injektion	27	36	NS
Hepatomegalie	50	29	0,010
Splenomegalie	7	0	<0,001
Nackensteifigkeit	10	17	NS
Temperatur bei Aufnahme: Mittelwert ± SD	38,9 ± 0,8	38,6 ± 0,8	NS

* Fieber war Einschlusskriterium.

Diagnosen der 53 Non-Tsutsugamushi-Fieber-Patienten

Bei 69% der stationär aufgenommenen Studienpatienten, die keinen Hinweis auf Infektion mit *R.tsutsugamushi* hatten, konnte eine Alternativdiagnose gestellt werden (Tab. 6). Keine definitive Diagnose konnte bei den 14 Patienten der Gruppe C1 wurde keine definitive Diagnose gestellt.

Diskussion

Diese Studie zeigt, wie auch schon andere zuvor (2, 4, 8, 9, 14), daß das Tsutsugamushi-Fieber eine häufige und weiterhin unterdiagnostizierte Ursache fieberhafter Krankheitsbilder in den ruralen Gebieten Südostasiens darstellt. Dies ist umso bedauerlicher, als diese potentiell tödlich verlaufende Erkrankung bei rechtzeitiger Diagnose einfach und billig behandelt werden kann. Während im gesamten Jahr 1993 in der ganzen Provinz 51 Fälle gemeldet worden waren (10), konnten wir an einer einzigen Abteilung des Maharaj Hospitals in lediglich 8 Wochen bei 30 Patienten ein Tsutsugamushi-Fieber diagnostizieren.

Haupterkenntnis der Studie war, daß der dabei untersuchte Dipstick-Test die derzeit einzig verfügbare praktische Methode darstellt, eine Infektion mit *R. tsutsugamushi* in den ländlichen Endemiegebieten zu diagnostizieren. Mit einer Sensitivität und Spezifität von 87% bzw. 94%, verglichen mit dem IIP-Test, ist der Dipstick-Test letzterem diesbezüglich nahezu ebenbürtig, weist aber entscheidende Vorteile hinsichtlich Praktikabilität auf. So ist seine Durchführung einfach, und das Ergebnis kann ohne Mikroskop abgelesen werden, ist leicht zu interpretieren und sehr schnell verfügbar. Die drei Studienärzte, welche keine spezielle Erfahrung in Labormedizin hatten und nur einige Stunden eingeschult worden waren, hatten keine größeren Probleme, die Untersuchung selbstständig auszuführen. Testergebnisse waren generell 1 Stunde nach Blutabnahme vorhanden. Ein weiterer Vorteil des Dipstick-Tests ist dessen kommerzielle Erwerbbarkeit, und zwar zu einem relativ günstigen Preis von 4 US$ pro Test. Der Umstand allerdings, daß der Test bei 50°C durchgeführt werden muß und daher ein Wasserbad

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 5:

Verteilung der IIP-Antikörpertiter (IgM and IgG) bei 30 Patienten mit akuter *R. tsutsugamushi* Infektion.

Antikörpertiter	Frequenz der Titer (%)	
	IgM	IgG
≤1:50	5 (17)	3 (10)
1: 100	2 (7)	2 (7)
1: 200	0 (0)	1 (3)
1: 400	2 (7)	3 (10)
1: 800	4 (13)	1 (3)
1:1600	3 (10)	4 (13)
1:3200	14 (47)	16 (53)

Tabelle 6:

Diagnosen von 27 Non-Tsutsugamushi-Fieber Patienten.

Diagnose	Frequenz	Diagnose	Frequenz
AIDS	5	Tuberkulose	5
+ Tuberkulose	3	Tb-meningitis	2
+ Kryptokokkenmeningitis	1	Tb-Perikarditis	2
+ Aseptische Meningitis	1	Tb-Spondylodiscitis	1
Pneumonie	4	Aseptische Meningitis	1
Akute Pyelonephritis	2	Leptospirosis*	1
Amöbenleberabszess	1	Sepsis	1
Angiostrongyloidiasis	1	Lungenkarzinom	1
Akute Bronchitis	1	Polymyalgia rheumatica	1
Subakute Cholangitis	1	Stevens-Johnson Syndrom	1
Hirnabszess	1		

* Vermutungsdiagnose

benötigt sowie die Erfordernis, die Reagenzien im Kühlschrank zu lagern, könnten den Gebrauch des Dipsticks in manchen Gebieten doch einschränken.

Die „wahre" Sensitivität könnte sogar höher sein, als die in dieser Studie berichtete. Bei zwei Patienten mit definitivem Tsutsugamushi-Fieber war der im Maharaj Hospital durchgeführte Dipstick-Test negativ gewesen und somit als falsch-negativ klassifiziert worden. Bei Wiederholung des Tests im AFRIMS in Bangkok, unter Verwendung der Originalsera, zeigte sich aber ein klar positives Testresultat. Zählte man diese beiden Fälle nun als richtig-positiv, erhöhte sich die Sensitivität von 87% auf ausgezeichnete 93%. Die anderen beiden Patienten mit einem als falsch-negativ gewerteten Dipstick-Test, hatten auch in der IIP am Tag 0 nur niedrige (<1:50), ebenfalls als negativ zu wertende Antikörpertiter, und zeigten erst in Folge einen signifikanten Anstieg. Drei falsch-positive Dipstick-Test-Resultate sind, bei Inbetrachtnahme der bis zu 70% hohen Seroprävalenzrate von Antikörpern gegen *R. tsutsugamushi* bei Gesunden in den Endemiegebieten (8), keineswegs überraschend.

Alle 3 Patienten hatten auch niedrige IIP-Antikörper. Mit 87% Sensitivität und 94% Spezifität ist der Dipstick-Test dem einzigen derzeit breit angewendeten Serodiagnostikum, dem Weil-Felix-Test, um ein Vielfaches überlegen. Der Weil-Felix-Test erbrachte in unserer Studie eine unakzeptabel niedrige Sensitivität.

Nicht wenige Kliniker bezweifeln allerdings überhaupt die Notwendigkeit einer Serodiagnose des Tsutsugamushi-Fiebers, und ziehen eine Diagnosestellung „ex juvantibus" vor. Obschon das rasche Abfiebern nach Antibiotikagabe typisch für Infektionen mit *R. tsutsugamushi* ist, tritt es auch bei verschiedenen anderen febrilen Krankheiten auf (23). Weiters wird das Tsutsugamushi-Fieber, insbesondere bei Patienten mit einer schweren bzw. komplizierten Verlaufsform, nicht immer in die initiale Differentialdiagnose miteinbezogen, und diese Patienten dann mit modernen Betalaktam-Antibiotika, die auch in Thailand zunehmend verfügbar sind, behandelt. Der Einsatz dieser, gegen Rickettsien intrinsisch nicht wirksamen Substanzen kann dann zu gefährlichen Verzögerungen bis zum Beginn einer adäquaten Chemotherapie führen. Die kürzlich erfolgte Erstbeschreibung von antibiotikaresistenten Rickettsienstämmen im Norden Thailands (20), stellt einen weiteren Grund dar, nicht auf eine Diagnosestellung „ex juvantibus" zu vertrauen, da Patienten, die mit diesen resistenten Stämmen infiziert sind, eben nicht dieses prompte Therapieansprechen zeigen.

In unserer Studie war das Tsutsugamushi-Fieber in 36% Ursache des akuten FUO. Dieser Prozentsatz ist höher als die von anderen Untersuchern berichteten 20-25% (2, 5). Eine gewisse „selection bias" mag dafür verantwortlich zeichnen, da bei jenen 17 Patienten, die einen negativen Dipstick Test aufwiesen und keiner stationären Aufnahme bedurften (Gruppe C2), kein Konfirmationstest (IIP) durchgeführt wurde. Die Prävalenz des Tsutsugamushi-Fiebers war bei dieser Patientengruppe mit ziemlicher Sicherheit geringer als 36%.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

In Ermangelung eines geeigneten Goldstandards zur Diagnose des Tsutsugamushi-Fiebers, wählten wir sowohl die IIP-Serologie als auch die Präsenz einer Primärläsion als Diagnosekriterien. Das Fehlen eines allgemein akzeptierten Goldstandards erschwert die Bewertung jedwedes diagnostischen Tests. Sensitivität und Spezifität eines serologischen Tests hängen vom gewählten Cut-off-Titer ab. Die von uns verwendeten Cut-off-Titer von IgM ≥1:400 und IgG ≥1:1600 für den IIP Test basierten auf den Erkenntnissen der Studien im Norden Thailands (5, 20) und erwiesen sich nun auch als für die Provinz Nakhon Ratchasima geeignet.

Drei der Studienpatienten hatten sowohl eine *P. falciparum*-Malaria als auch, die Diagnose Tsutsugamushi-Fieber bestätigende, IIP-Antikörpertiter gegen *R. tsutsugamushi*. Eine Koinfektion mit diesen beiden Pathogenen ist natürlich möglich, zumal beide Infektionen in ruralen, mehr oder weniger bewaldeten Regionen akquiriert werden, und bei allen 3 genannten Patienten war auch anamnestisch ein Waldaufenthalt zu eruieren.

Doppelinfektionen von Malaria und Tsutsugamushi-Fieber werden auch in der Literatur berichtet (1, 4, 6). Andererseits waren wir doch überrascht, daß all jene Patienten mit einer Malaria gleichzeitig auch eine akute Infektion mit *R. tsutsugamushi* durchmachten. Die Möglichkeit kreuzreagierender Antikörper muß in Erwägung gezogen werden, obschon dies wiederum unwahrscheinlich scheint, da es sich bei Plasmodien bzw. Rickettsien um sehr unterschiedliche Lebewesen handelt, und zudem der IIP-Test als sehr spezifisch für *R. tsutsugamushi* gilt — selbst Kreuzreaktionen zwischen den verschiedenen Rickettsienspezies sind ausgesprochen selten. Nichtsdestoweniger sollte die Frage möglicher Kreuzreaktionen weiter untersucht werden.

Die epidemiologischen Merkmale und das klinische Bild der 30 hier beschriebenen Fälle von Tsutsugamushi-Fieber entsprachen im wesentlichen bereits bekanntem (8, 10, 13). Typische kutane Primärläsionen fanden wir allerdings in einem höheren Prozentsatz als üblich bei asiatischen Patienten (2, 7, 23). Auf die Bedeutung einer sorgfältigen physikalischen Untersuchung sei hier nochmals hingewiesen. Die typische „eschar", obschon leider nur in einer Minderheit der Infektionen mit *R. tsutsugamushi* auftretend, ist nahezu pathognomisch für das Tsutsugamushi-Fieber in Thailand, da andere Krankheiten, die ähnliche Hautveränderungen aufweisen können, wie das Zeckenbissfieber (16) oder auch der kutane Milzbrand, ausgesprochen selten vorkommen. Das Ansprechen auf die spezifische Therapie mit Doxycyclin und Chloramphenicol war generell gut, und es gab keine Todesfälle unter den Tsutsugamushi-Fieber Patienten. In 4 Fällen (13%) war allerdings eine komplizierte Verlaufsform zu beobachten. Zwei zeigten die klinischen Merkmale einer respiratorischen Insuffizienz mit interstitieller Pneumonie im Lungenröntgen, und 2 weitere eine Beteiligung des ZNS.

Aufgrund der in dieser Studie gewonnenen Daten kann der Gebrauch des untersuchten Dot-Blot-Immunoassays im klinischen Alltag nur empfohlen werden. Der Test bietet enorme Vorteile in Bezug auf Sensitivität und Spezifität verglichen mit dem Weil-Felix Test. Der Dipstick-Test ist zudem bereits käuflich erwerbbar, preiswert, unkompliziert in seiner Durchführung und Interpretation des Resultats. Die Schnelligkeit, mit der der Test imstande ist, Ergebnisse zu liefern, und so zeitgerecht die Entscheidung des Klinikers am Krankenbett zu beeinflussen, wird derzeit von keinem anderen Test erreicht.

Zusammenfassung

Das Tsutsugamushi-Fieber, verursacht durch *Rickettsia tsutsugamushi,* ist eine häufige und potentiell tödlich verlaufende Zoonose, die vor allem in den ruralen Gebieten Südostasiens vorkommt.

Das Hauptproblem dieser Erkrankung liegt bei deren Diagnose. Die derzeit vorhandenen diagnostischen Methoden sind in der Regel sehr aufwendig und teuer und daher generell in den medizinischen Einrichtigungen der Gebiete, wo das Tsutsugamushi-Fieber eben auftritt, nicht verfügbar .Ziel dieser diagnostischen klinischen Studie war die Evaluation eines neu entwickelten und bereits kommerziell erwerbbaren Dot-Blot Immunoassays, kurz Dipstick-Test genannt.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Der Dipstick-Test wurde in der Zeit vom 13. November 1995 bis 5. Jänner 1996 bei 100 Erwachsenen, die wegen akuten Fiebers unklarer Genese die interne Abteilung des Maharaj Hospitals in Nakhon Ratchasima im Nordosten Thailands aufgesucht hatten, angewendet. Eine detaillierte Beurteilung des Tests war schließlich bei 83 Patienten möglich. In 30 Fällen wurde ein Tsutsugamushi-Fieber diagnostiziert, entsprechend einer erstaunlich hohen Prävalenz von 36% für diese Erkrankung unter den akut fiebernden Patienten am Maharaj Hospital. Eine kutane Primärläsion („eschar") fand sich bei 43%, und 13% zeigten einen komplizierten Verlauf, wobei der Respirationstrakt sowie das zentrale Nervensystem betroffen waren.

Die Bestätigung der Diagnose erfolgte durch die Resultate des indirekten Immunoperoxidase (IIP) Tests und/oder das Vorhandensein eines typischen klinischen Bildes mit pathognomischer Hautläsion. Verglichen mit diesen Bestätigungstests zeigte der Dipstick-Test vielversprechende 87% Sensitvität und 94% Spezifität.

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen, daß dieser leicht durchzuführende und innerhalb einer Stunde Resultate liefernde Test sehr gut in der Routinediagnostik akut fieberhafter Zustände in Endemiegebieten eingesetzt werden kann.

Schlüsselwörter *Rickettsia tsutsugamushi*, Tsutsugamushi-Fieber, Dipstick-Test, Indirekter Immunoperoxidase Test, Weil-Felix-Test, Thailand.

Summary

Evaluation of a newly developed dipstick test for the rapid diagnosis of scrub typhus in febrile patients

Scrub typhus, caused by *Rickettsia tsutsugamushi* is a common and potentially fatal disease occuring mainly in the rural areas of South East Asia.

A major problem with this disease is the difficulty with which it can be diagnosed. The various sophisticated diagnostic techniques available are not generally suitable to the rural clinical setting, where cases of scrub typhus are usually seen. The aim of this diagnostic clinical trial was the evaluation of a newly developed and already commercially available dot-blot immunoassay or dipstick test.

Between 13 November 1995 and 5 January 1996 the test was performed on sera from 100 adult patients with acute fever of unknown origin presenting at the medical department of the Maharaj Hospital in Nakhon Ratchasima (Korat). Detailed evaluation of the dipstick could be made in 83 patients. A total of 30 cases of scrub typhus were confirmed, giving a prevalence of 36% for this disease among acute febrile patients presenting at the Maharaj Hospital. An eschar was found in 43%, and complications, mainly affecting the respiratory and central nervous system, were observed in 13% of patients with scrub typhus.

Diagnosis was confirmed by the results of IIP serology and/or typical clinical picture with presence of an eschar. Compared with these confirmatory tests, the dipstick showed a promising 87% sensitivity and 94% specificity.

These data suggest that this easy to perform and fast dipstick test, providing results within 1 hour, is well suited for the routine use in the diagnosis of febrile illnesses at rural clinical settings.

Key words *Rickettsia tsutsugamushi*, scrub typhus, dipstick test, indirect immunoperoxidase test, Weil-Felix test, Thailand.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

Literatur

1. BERMAN, S.J., KUNDIN, W. D. (1973):
Scrub typhus in South Vietnam: A study of 87 cases.
Ann. Intern. Med., 79: 26-30.

2. BROWN, G. W., ROBINSON, D. M., HUXSOLL, D. L. (1976):
Scrub typhus: a common cause of illness in indigenous populations.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 70: 444-8.

3. BROWN, W .B., ROBINSON, D. M., HUXSOLL, D. L. (1977):
Serological evidence for a high incidence of transmission of R. tsutsugamushi in two Orang Asli settlements in peninsular Malaysia.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 27 (1): 121-4.

4. BROWN, G. W., SHIRAI, A., ROGERS, C. (1983):
Diagnostic criteria for scrub typhus:
probability values for immunofluorescent antibody and Proteus OXK agglutinin titers.
A. J. Trop. Med. Hyg., 32 (5): 1101-7.

5. CHOURIYAGUNE, C., WATT, G., STRICKMAN, D. (1992):
The Weil-Felix test for the diagnosis of scrub typhus in Thailand.
Intern. Med., 8 (2): 29-33.

6. DELLER, J. J., RUSSELL, P. K. (1967):
An analysis of fevers of unknown origin in American soldiers in Vietnam.
Ann. Intern. Med., 66: 1129-43.

7. IRONS, E. N., ARMSTRONG, H. E. (1947):
Scrub typhus in Dutch New Guinea.
Ann. Intern. Med., 26: 201-20.

8. JOHNSON, D. E., CRUM, J. W., HANCHALAY, S. (1982):
Seroepidemiological survey of Rickettsia tsutsugamushi infection in a rural Thai village
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 76 (1): 1-3.

9. KELLY, D. J., WONG, P. W., GAN, E. (1988):
Comperative evaluation of the indirect immunoperoxidase test for the serodiagnosis of rickettsial disease.
Am. J. Trop. Hyg., 38 (2): 400-6.

10. MINISTRY OF HEALTH OF THAILAND (1993):
Annual Epidemiological Surveillance Report; 291-9.

11. MINISTRY OF HEALTH OF THAILAND DIVISION OF EPIDEMIOLOGY WESR (1996): 27, 3.

12. OLSON, J. G., BOURGEOIS, L. (1977):
Rickettsia tsutsugamushi infection and scrub typhus incidence among Chinese military personnel in the Pescadores Islands.
Am. J. Epidemiol., 106 (2): 172-5.

13. OLSON, J. G., BOURGEOIS, A. L. (1979):
Changing risk of scrub typhus in relation to socioeconomic development in the Pescadores Islands of Taiwan.
Am. J. Epidemiol., 109: 236-43.

14. SAUNDERS, J. P., BROWN, G. W., SHIRAI, A. (1980):
The longivity of antibody to R. tsutsugamushi in patients with confirmed scrub typhus
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 74: 253.

15. SAYEN, J. J., POND, H. S., FORRESTER, J. S. (1946):
Scrub typhus in Assam and Burma a clinical study of 616 cases.
Medicine, 25: 155-214.

16. SIRISANTHANA, T., PINYOPORNPANIT, V., SIRISANTHANA, V. (1994):
First cases of spotted fever group rickettsiosis in Thailand.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 50 (6): 682-6.

17. STRICKMAN, D., TANSKUL, P., EAMSILA, C. (1994):
Prevalence of antibodies to rickettsiae in the human population of suburban Bangkok.
Am: J. trop. Med., 51 (2): 149-53.

18. SUGITA, Y., NAGATANI, T., OKUDA, K. (1992):
Diagnosis of typhus infection with Rickettsia tsutsugamushi by polymerase chain reaction.
J. Med. Microbiol., 37: 357-60.

19 TAKADA, N., KHAMBOONRUANG, C., YAMAGUCHI, T. (1984):
Scrub typhus an chiggers in North Thailand. Southeast Asian
J. Trop. Med. Hyg. Pub. Hlth., 15 (3): 402-6.

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

20. WATT, G., CHOURIYAGUNE, C., RUANGWEERAYUD, R., WATCHARAPICHAT, P. PHULSUKSOMBATI, D. (1996): Scrub typhus infections poorly responsive to antibiotics in Northern Thailand. Lancet, 348: 86-9.

21. WATT, G., STRICKMAN, D. (1994): Life-threatening scrub typhus in a traveler returning from Thailand. Clin. Infect. Dis., 18: 624-6.

22. WEDDLE, J. R., CHAN, T. C., THOMPSON, K. (1995): Effectiveness of a dot-blot immunoassay of anti-R. tsutsugamushi antibodies for serologic analysis of scrub typhus. Am. J. Trop. Med. Hyg., 53 (1): 43-6.

23. WILDE, H., PORNSILPATIP, S., SOKLY, T. (1991): Murine and scrub typhus at Thai-Kampuchean border displaced persons camp. Trop. Geogr. Med., 43: 363-9.

Korrespondenzadresse Dr. Hermann Laferl
4. Med. Abt. mit Infektions- und Tropenmedizin
Kaiser Franz Josef Spital

Kundratstraße 3
A-1100 Wien · Austria

©Österr. Ges. f. Tropenmedizin u. Parasitologie, download unter www.biologiezentrum.at

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie

Jahr/Year: 1997

Band/Volume: 19

Autor(en)/Author(s): Laferl Hermann, Chappuis F., Akkhavong K., Looareesuwan S., Wilairatana P., Viravan C., Wangsuphachart V., Chinprasatsak S., Eamsila C., Watt G.

Artikel/Article: Evaluation eines neu entwickelten Dipstick-Tests zur Schnelldiagnose des Tsutsugamushi-Fiebers. 113-124