

İnterferon Gama Salınım Testleri (IGRA) ve Güncel Kullanım Rehberleri

Dr. Nuri ÖZKÜTÜK

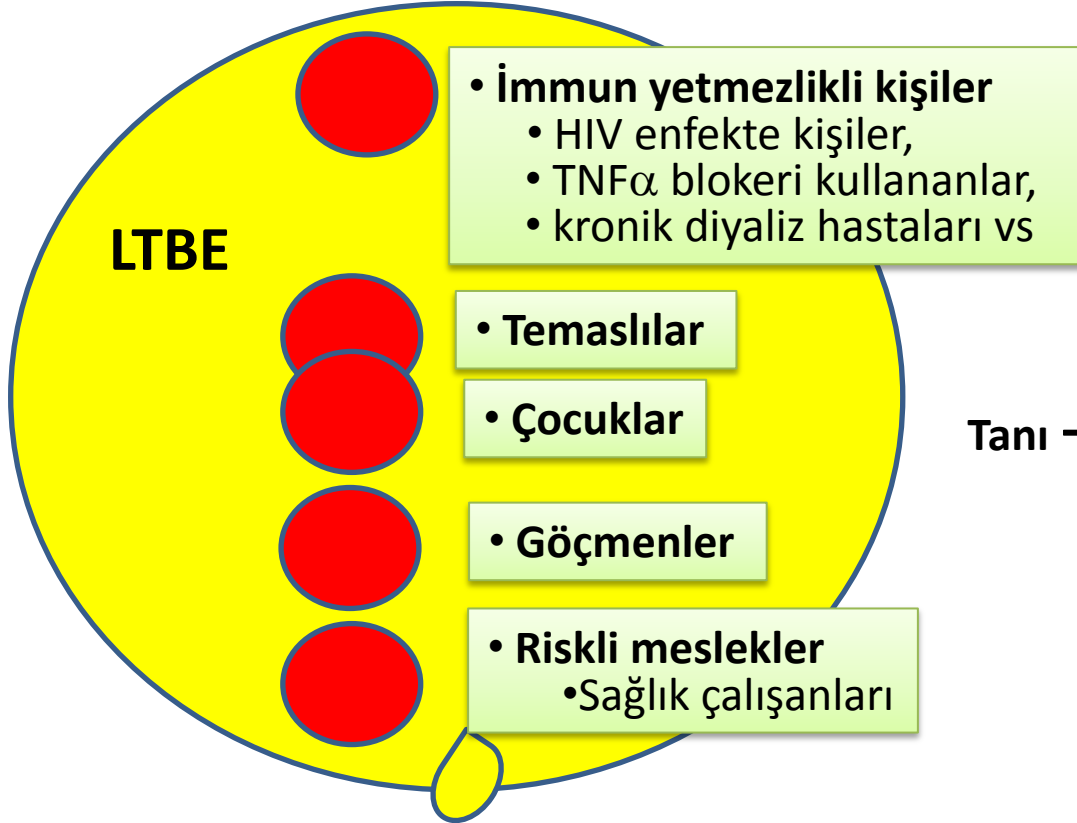
Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

16. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi
13-17 Mart 2013, ANTALYA

Sunum Planı

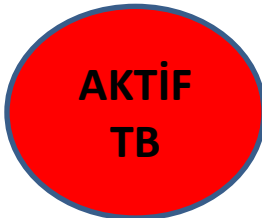
- Giriş
- IGRA türleri ve prensipleri
- Uygulama alanları
- Rehber Önerileri

M. tuberculosis enfeksiyonu =



Tanı → Koruyucu tedavi → TB KONTROLÜ

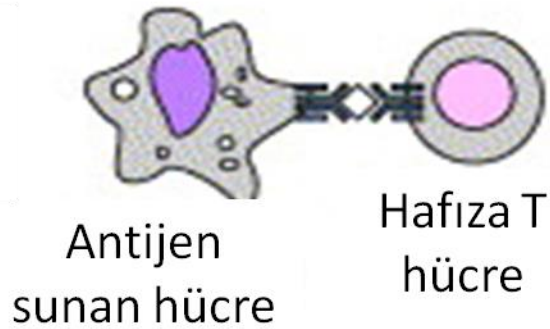
+



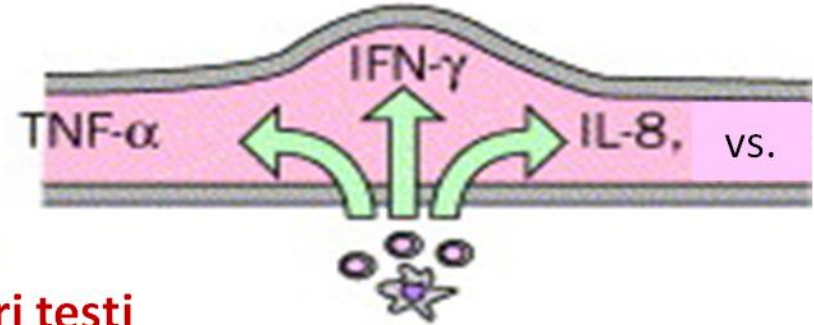
Erken Tanı → Etkili tedavi → TB KONTROLÜ

LTBE tanısında kullanılan testlerin çalışma prensipleri

Mikobakteriyel antijenlerin sunumu

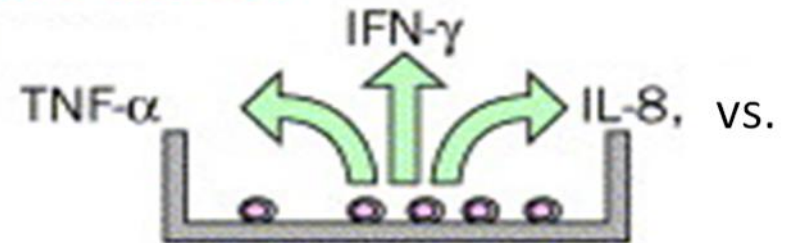


Endurasyonun ölçülmesi



Deri testi

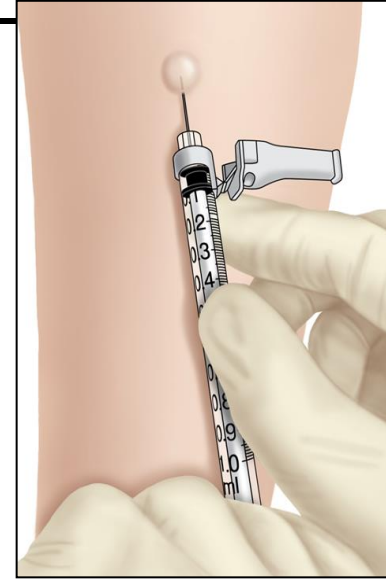
İn-vitro kan testi



IFN- γ üretiminin ölçülmesi

Tüberkülin Deri Testi (TDT)

- Antijen: **PPD**
 - *MTBC*'e ait çok sayıda antijenin bir karışımıdır
 - *M. bovis* BCG ve pek çok TDM için de **ortaktır**.
- TDT **yanlış pozitif** sonuçlar verebilir.
 - BCG ile aşılananlarda,
 - TDM ile enfekte olanlarda,
- Uygulama ve değerlendirmede de hatalar görülebilir.



İnterferon Gama Salınım Testleri

(Interferon-Gamma Release Assay, IGRA)

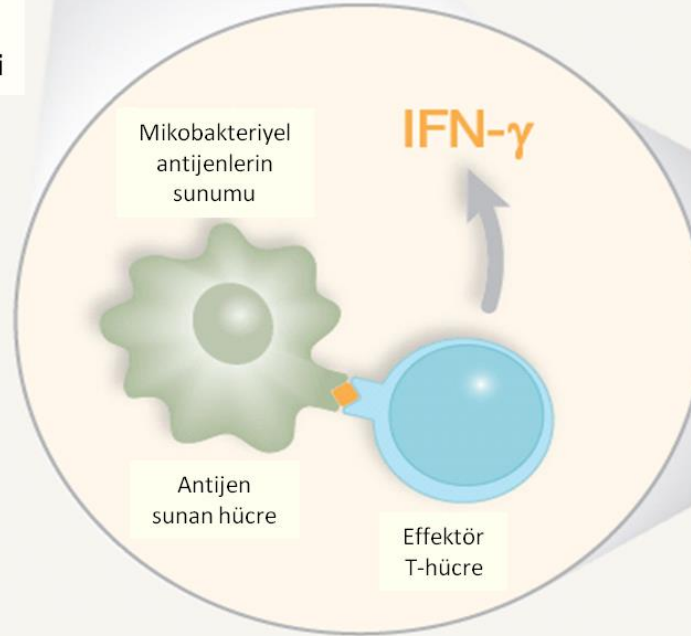
- TDT'ne alternatif olarak geliştirilmiş **T-hücre temelli yöntemler**
- *M. tuberculosis* antijenlerine karşı *in vitro* IFN- γ salınımının saptanmasına dayalıdır.
- Bu testler, TB enfeksiyonu tanısında son yüzyıldaki en önemli gelişmelerden biri olarak görülmektedir.

Non-spesifik invivo deri testi

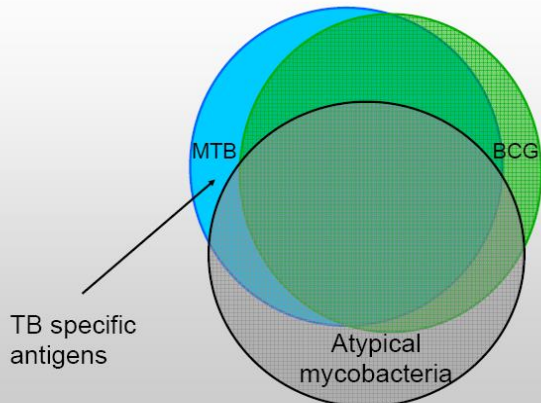
PPD'ye non-spesifik cevabın neden olduğu endurasyonun ölçülmesi

Spesifik invitro kan testi

TB-spesifik antijenlerin (ESAT-6, CFP-10, TB7.7) uyardığı IFN- γ düzeyinin ölçülmesi



Mycobacteria shares most antigens



Tuberculosis Complex	ESAT-6	CFP-10	TB-7.7	TST	Environmental Strains	ESAT-6	CFP-10	TB-7.7	TST
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	+	+	<i>M. abcessus</i>	-	-	-	+
<i>M. africanum</i>	+	+	+	+	<i>M. avium</i>	-	-	-	+
<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	<i>M. branderi</i>	-	-	-	+
					<i>M. celatum</i>	-	-	-	+
BCG Substrain	ESAT-6	CFP-10	TB-7.7	TST	<i>M. chelonae</i>	-	-	-	+
<i>Gothenberg</i>	-	-	-	+	<i>M. fortuitum</i>	-	-	-	+
<i>Moreau</i>	-	-	-	+	<i>M. goodii</i>	-	-	-	+
<i>Tice</i>	-	-	-	+	<i>M. intracellulare</i>	-	-	-	+
<i>Tokyo</i>	-	-	-	+	<i>M. kansasii</i>	+	+	-	+
<i>Danish</i>	-	-	-	+	<i>M. malmoense</i>	-	-	-	+
<i>Glaxo</i>	-	-	-	+	<i>M. marinum</i>	+	+	-	+
<i>Montréal</i>	-	-	-	+	<i>M. oenavense</i>	-	-	-	+
<i>Pasteur</i>	-	-	-	+	<i>M. scrofulaceum</i>	-	-	-	+
					<i>M. smegmatis</i>	-	-	-	+
					<i>M. szulgai</i>	+	+	-	+
					<i>M. terra</i>	-	-	-	+
					<i>M. vaccae</i>	-	-	-	+
					<i>M. xenopi</i>	-	-	-	+

ESAT-6 (early secreted antigenic target-6)
CFP-10 (culture filtrate protein-10)
TB7.7 antijen (Peptid-4)

İNTERFERON GAMA SALINIM TESTLERİ

- **QuantiFERON–TB Gold in Tube (QFT-GIT)** (Cellestis Ltd.,Australia)



- **T-SPOT.TB** (Oxford Immunotec, UK)



QuntiFERON-TB Gold in Tube (QFT-GIT)

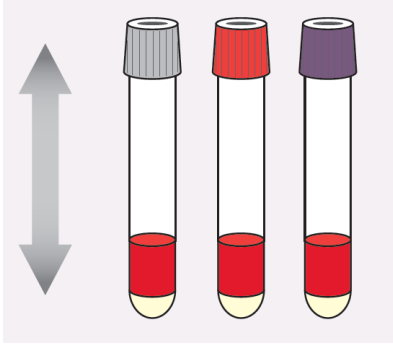


- Test prensibi;

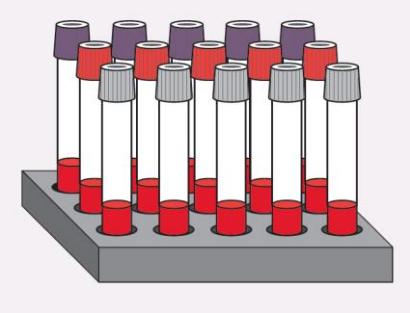
Tam kan örneğinde, *in vitro* koşullarda, özgül antijenler ile uyarılan T-hücrelerce salınan **IFN- γ** düzeyinin **ELISA yöntemi** ile belirlenmesidir.

- Kontrol materyalleri ve antijenler özel tüplerde hazır olarak bulunur ve kan direkt olarak bu tüplere alınır.
- Antijen olarak **ESAT-6**, **CFP-10**'a ek olarak **TB7.7** de kullanılmıştır.
- Böylece testin duyarlılığı artırılmaya çalışılmıştır.

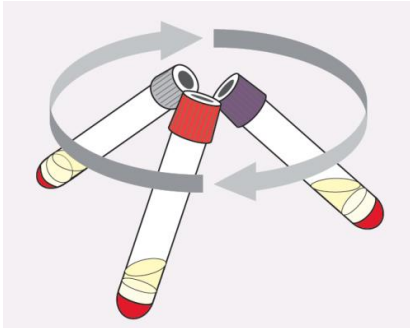
Yöntem (QFT-GIT)



Özel tüplere alınan kan, yukarı aşağı çalkalanarak, 5 sn karıştırılır

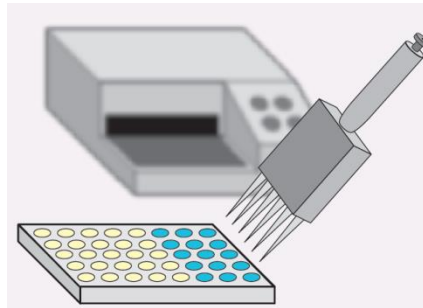


Tüpler, 16 saat içinde dik olarak 37°C'de 16-24h inkübe edilir

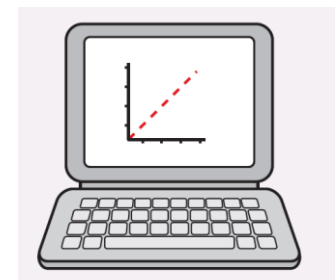


tüpler santrifüj edilir, plazma ayrılır. (15dk, 2000-3000g)

- Kan, test için hazır 3 tüpe alınır, karıştırılır
 - negatif kontrol
 - pozitif kontrol (fitohemaglutinin)
 - Test tüpü (tüm antijenlerin karışımı) (ESAT-6 ,CFP-10, TB7.7)
- 16-24 saat inkübe edilir,
- Inkübasyon sonrası ayrıştırılan plazmada ELISA yöntemiyle IFN - γ düzeyi belirlenir.



ELISA ile IFN- γ (IU/mL) miktarı ölçülür



QFT-GIT analiz programı ile sonuçlar hesaplanır

T-SPOT.TB testi

(Oxford Immunotec, UK)

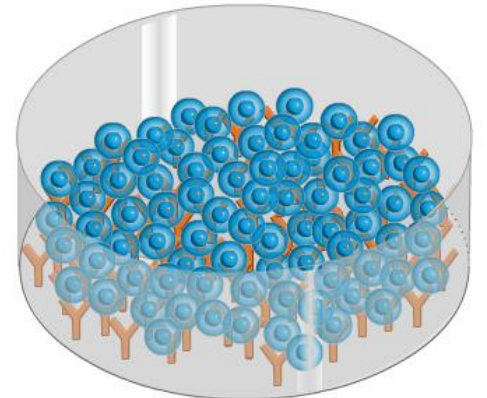
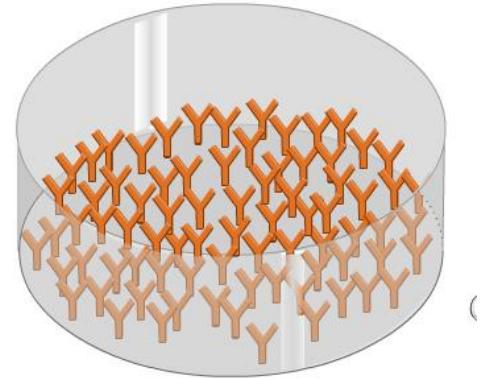
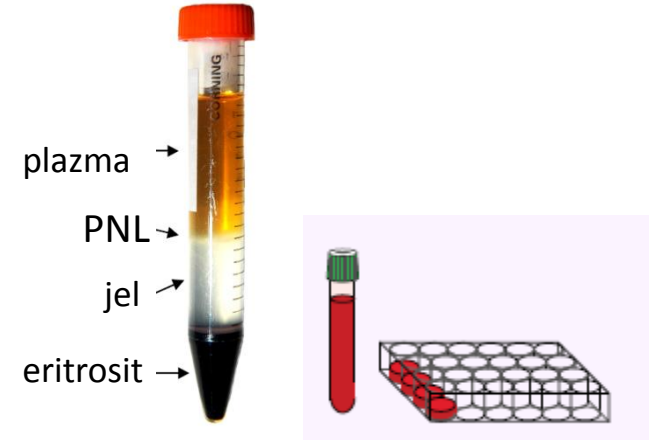
- Test prensibi;

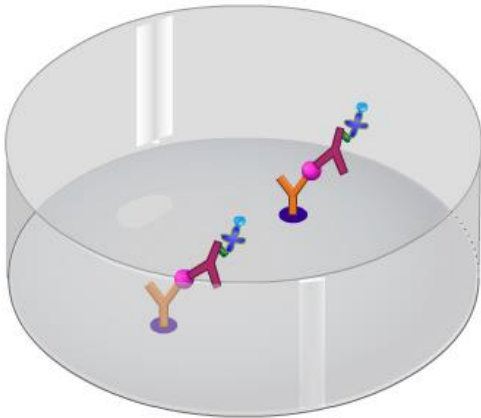
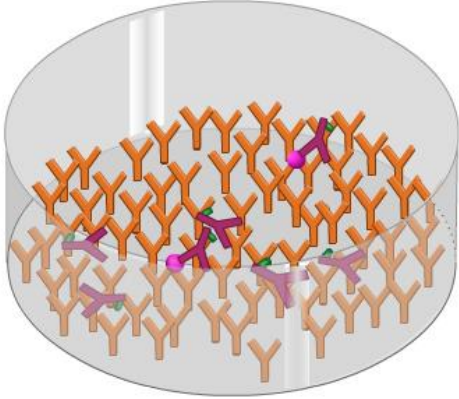
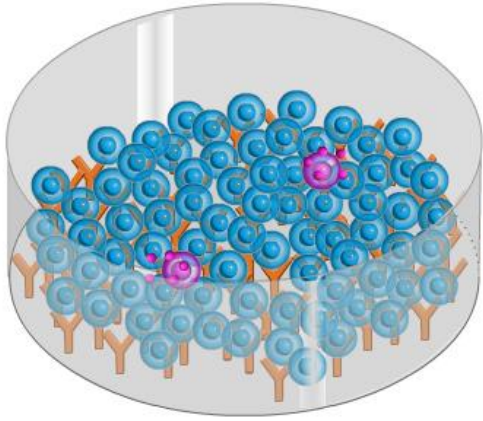
Periferik kan mononükleer hücrelerin, *in vitro* koşullarda, özgül antijenlerle uyarıldığına **IFN - γ** **salan T-hücrelerin sayısı**nın çift sandviç ELISA yöntemi ile belirlenmesidir

(**ELISPOT**, “enzyme-linked immunospot assay”)

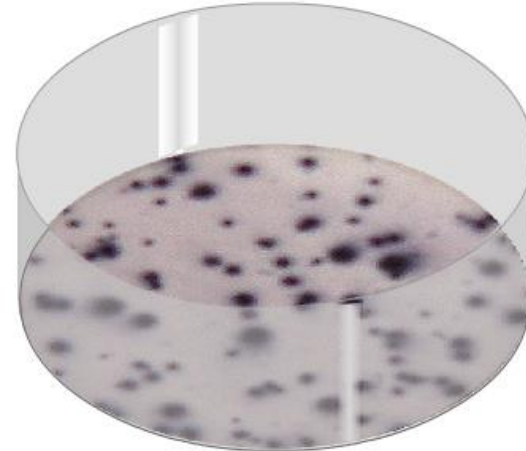
Yöntem

- Heparinli kandan hücre santrifüjü ile PNL'ler ayrıştırılır.
- Hücreler **anti-IFN- γ** kaplı mikroplağın 4 kuyucuğuna dağıtılır.
- Antijenler eklenir.
 - **ESAT-6**
 - **CFP-10**
 - **pozitif kontrol** (fitohemaglutinin)
 - **negatif kontrol**
- 16-20 saat inkübasyon





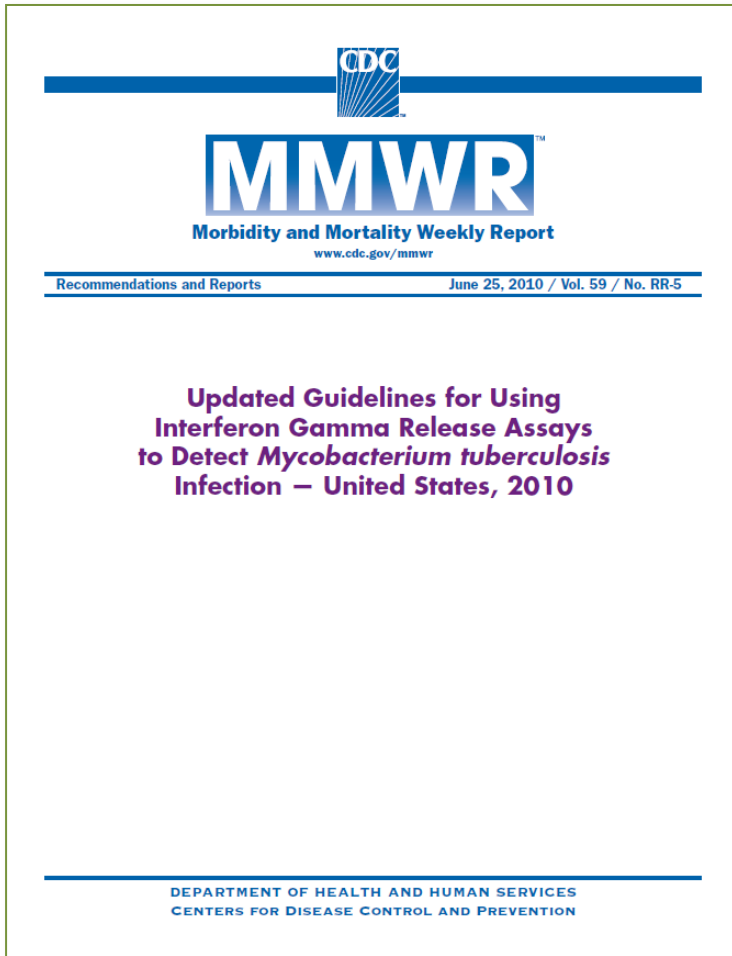
- T hücrelerden salınan **IFN- γ** plak tabanındaki **anti-IFN- γ** ile bağlanır.
- Konjuge sekonder antikörler eklenir
- Plak tabanında noktacıklar şeklinde (spot) bağlanma alanları gözlenir.
- Spotların her biri özgül antijen ile uyarılmış bir T hücresinin gösterir.
- Spotlar gözle veya optik okuyucu ile sayılır, kontroller ile karşılaştırılarak değerlendirilir



IGRA'ların Avantajları ve Dezavantajları

	TDT	QFT-GIT	T-SPOT.TB
BCG ile çapraz reaksiyon	Var	Yok	Yok
TDM ile çapraz reaksiyon	Var	Yok	Yok
Değerlendirmeye bağlı değişken sonuç	Var	Yok	Spot sayımında
Booster etkisi	Var	Yok	Yok
Test için ziyaret sayısı	İki	Bir	Bir
Test sonuçlanması	48-72 h	24-48 h	24-48 h
Test maliyeti	Düşük	Yüksek	Yüksek
Lab gereksinimi	Yok	Var	Var
Hücre kaynağı	Deri	Tam kan	Periferik MNL

KULLANIM ALANLARI ve REHBER ÖNERİLERİ

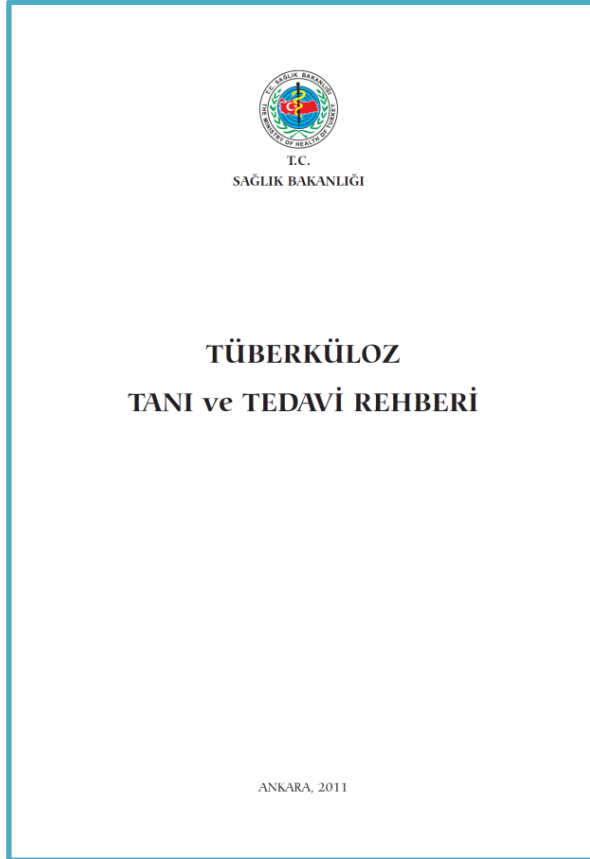


KULLANIM ÖNERİLERİ

- PubMed
“interferon-gamma release assays”
 - >1200 yayın
 - 120 meta analiz/ derleme
- >30 Rehber
 - Ulusal
 - ABD (CDC, AAP), İngiltere, Kanada, Brezilya, Fransa, İspanya, İtalya, Almanya, Avusturya, Portekiz, İrlanda, İsviçre, Hollanda, Danimarka, Norveç, Finlandiya, Çek Cum., Slovakya, Polonya, Bulgaristan, Hırvatistan, S.Arabistan, Avustralya, G.Kore, Japonya
 - Uluslar arası
 - ECDC, WHO



KULLANIM ÖNERİLERİ



Kullanım rehberlerinde ana yaklaşımlar

1. İki basamaklı kullanım:
önce TDT sonra IGRA
2. Tek başına IGRA
3. TDT ya da IGRA
4. Her ikisi birden

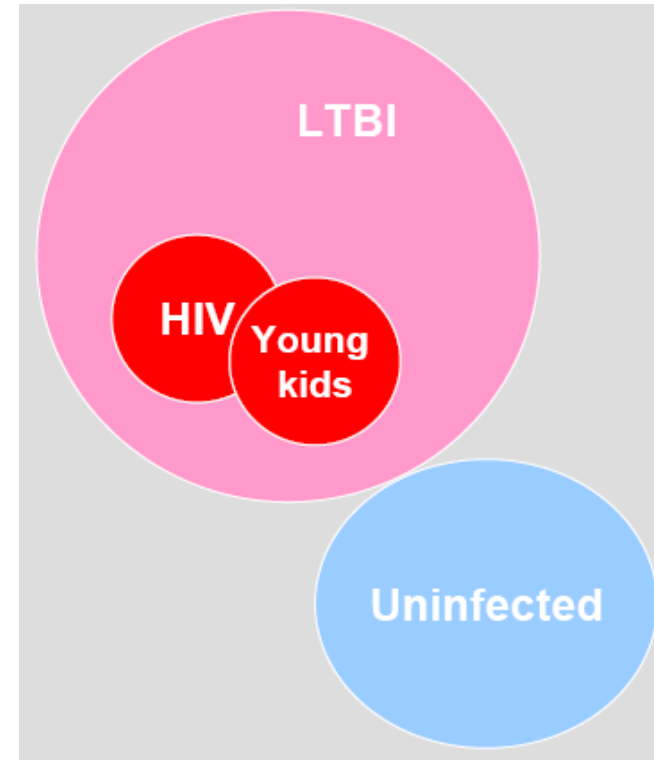


LTBE tanısında IGRA

- Sistematik LTBE taramasında bu testlerin kullanım endikasyonu yoktur.
- Bu testlerin ana amacı aktif TB gelişme riski yüksek olan LTBE'lilerin tedavisinin sağlanmasıdır.
- Bu nedenle sadece koruyucu tedaviden yararlanacak kişiler test edilmelidir.

LTBE tanısında IGRA

- Temaslı taramasında,
- Çocuklarda
- İmmün yetmezlikli kişilerde
 - HIV enfekte kişiler,
 - TNF α blokeri kullananlar,
- Göçmen taramasında,
- Sağlık çalışanlarının seri taramasında.



Erişkin temaslı taramasında rehber önerileri

WHO, Brezilya, ECDC (↑ insidanslı ülkeler)	Sadece TDT
ECDC (↓insidanslı ülkeler) Kanada (↓riskli temaslılar), İngiltere, Almanya, İtalya, İsviçre, İspanya, Suudi Arabistan, Hollanda, Norveç, Bulgaristan, Portekiz, İrlanda	TDT pozitif ise IGRA (ya sadece BCG'lilerde ya da BCG'den bağımsız)
[CDC, Danimarka, Finlandiya]→ BCG'lilerde IGRA tercih edilir Avusturya	TDT veya IGRA
Kanada (↑riskli temaslılar), Çek Cum., Hırvatistan, Avusturya, Avustralya (IGRA eklenmesi kabul edilebilir)	TDT ve IGRA
Slovakya, Japonya, Fransa	Sadece IGRA

ÖZET:

- Özellikle **yüksek TB insidanslı ülkelerde** IGRA'ların kullanılmamaları,
- Düşük insidanslı ülkelerde** ise iki basamaklı yaklaşımın (**pozitif TDT'yi takiben IGRA**) gereksiz koruyucu tedavileri azaltacağı savunulmaktadır.

Çocuk temaslı taramasında



- Özellikle çok ufak çocuklar için veriler sınırlı.
- **TDT ve IGRA çocuklarda TB enfeksiyonunun belirlenmesinde benzer doğruluğa sahip**
- TDT ve IGRA'ların yalancı negatiflikleri daha sık
 - Özellikle <5 yaş çocuklarda immunulojik maturasyon yetersiz

Çocuk temaslı taramasında rehber önerileri

WHO, ECDC , Fransa, Brezilya, İsviçre (kuşkulu olgularda +IGRA), Slovakya (BCG'siz çocuklar), G.Kore (<5 yaş)	Sadece TDT
Kanada (↓risk temaslılar), Japonya, İrlanda, ABD- AAP (> 5yaş için IGRA TDT'nin yerini de alabilir)	0-4 Yaş → Sadece TDT 5-17 yaş → TDT pozitif ise IGRA
Almanya,İtalya, İspanya, S.Arabistan, Hollanda (BCG durumu bağlı), Bulgaristan, Portekiz, İngiltere (sadece >5 yaş için)	TDT pozitif ise IGRA
Portekiz (<5 yaş), İngiltere (2-5 yaş)	TDT negatif ise IGRA
ABD-CDC (<5 yaşta tercih TDT), Danimarka, Finlandiya, G. Kore (>5 yaş; fakat tercih TDT),	TDT veya IGRA
Kanada (↑riskli temaslılar), Çek Cum., Hırvatistan, Avustralya (>2 yaşta IGRA eklenmesi kabul edilebilir)	TDT ve IGRA
Norveç	Sadece IGRA

AAP, American Academy of Pediatrics

Çocuk temaslı taramasında rehber önerileri

ÖZET:

- **5 yaş altında** → tek başına **TDT** önerilmekte.
- **Beş yaş üstünde** →
 - tek başına **TDT** veya
 - **iki basamaklı yaklaşım** uygulanabilir.
 - özellikle BCG aşıllı çocuklarda
- Bu grupta hiçbir testin tek başına LTBE'nu ekarte etmeyeceği unutulmamalıdır.

İmmun yetmezlikli kişilerde

- İmmun yetmezliklilerde TDT ve IGRA'ların duyarlılıkları düşüktür.
 - TDT'nin anerjisine sık rastlanmakta, yalancı negatif sonuçlar alınabilmektedir.
 - IGRA'larda da yalancı negatif ve belirsiz sonuçlarda artış olabilmektedir.
 - Ör. AIDS hastalarında CD4 <200 ise
- Ancak, immün yetmezliklilerde LTBE'ünü belirlemede IGRA'ların TDT'ne göre daha duyarlı olduğu bildirilmektedir.
 - Fakat testler arası farklar az
 - **T-SPOT-TB → ~ % 70 > QFT-GIT → ~ % 60**

HIV enfeksiyonlularda rehber önerileri



WHO , Brezilya	Sadece TDT
İspanya (BCG aşılıysa)	TDT pozitif ise IGRA
Kanada, İtalya, İspanya, S.Arabistan, İrlanda	TDT negatif ise IGRA
Danimarka, Avusturya	TDT veya IGRA
ECDC , Portekiz, Hırvatistan, Slovakya, Hollanda, CDC (herhangi biri negatif ise diğeri), İngiltere (CD4 <200)	TDT ve IGRA
İngiltere (CD4 200-500 ise) (alternatif:TDT+IGRA), İsviçre, Fransa, Bulgaristan,	Sadece IGRA

ÖZET:

- Duyarlılığı artırmak amacı ile **her iki testin eş zamanlı kullanılması** (IGRA+TDT) en çok önerilen yaklaşımdır.
- Negatif IGRA sonuçlarının LTBE'unu ekarte etmeyeceği unutulmamalıdır.

TNF α blokeri kullananlarda



- LTBE olanlarda TNF α blokeri tedavisinin aktif TB hastalığı gelişme riskini belirgin olarak artırdığı gösterilmiştir.
- TNF α blokeri tedavisi başlanacak hastalarda LTBE aranması, Gerekğinde de koruyucu tedavi verilmesinin uygun olacağı savunulmaktadır.
- Kanıtlar, immuniteye bağlı enflamatuvar hastalıklarda LTBE tanısında tek başına IGRA'lerin TDT'den üstün olduğunu desteklememektedir.

TNF α blokeri kullananlarda rehber önerileri

Brezilya	Sadece TDT
İspanya, Norveç	TDT pozitif ise IGRA
Kanada, İtalya, İspanya, S.Arabistan	TDT negatif ise IGRA
Avustralya (ARA) , Danimarka (tercih IGRA)	TDT veya IGRA
ECDC, İngiltere (alternatif:sadece IGRA), CDC (herhangi biri negatif ise diğeri), Portekiz, Hırvatistan, Çek Cum., Slovakya, Hollanda, İrlanda	TDT ve IGRA
Almanya, İsviçre, Fransa, Avusturya, Bulgaristan, Japonya, Polonya	Sadece IGRA

ARA, Australia Rheumatology Association;

ÖZET:

- **Her iki testin eş zamanlı kullanılması (TDT+IGRA)** en çok önerilen yaklaşımdır.

Göçmenlerin taraması için rehber önerileri



- Düşük TB insidanslı ülkelerde, TB olgularının çoğunu yüksek insidanslı ülkelere gelen göçmenler oluşturmaktadır.



- Düşük insidanslı ülkeler, TB kontrolü için göçmenleri TB enfeksiyonu yönünden taramaktadır.

Göçmenlerin taraması için rehber önerileri

İngiltere (5-15 yaş), İtalya, İsviçre, İspanya, Norveç, İrlanda, Bulgaristan, Slovakya, Fransa (çocuklarda), Hollanda (sadece çocuklar; BCG durumuna bağlı)	TDT pozitif ise IGRA
CDC (BCG aşıllılarda IGRA), Kanada, Avustralya	TDT veya IGRA
İngiltere (16-35 yaş; veya alternatif olarak sadece IGRA), Çek Cum	TDT ve IGRA
Fransa (erişkinlerde)	Sadece IGRA
Japonya, S.Arabistan, Brezilya, Portegiz, Danimarka, G.Kore, Finlandiya, Polonya, Avusturya, Hırvatistan, Almanya	Öneri Yok/ önerilmemekte

ÖZET:

- Özellikle düşük TB insidanslı ülkelere giriş yapan tüm göçmenlerin LTBE açısından taramasında en yaygın algoritma **iki basamaklı yaklaşımdır**.

Sağlık çalışanların seri taramasında öneriler



- TB teması açısından yüksek riskli grupların LTBE yönünden seri testleri önerilmektedir.
 - Sağlık çalışanları ve mahkumlar gibi
 - Konversiyon saptanır $\Rightarrow$ koruyucu tedavi
- Seri testlerde IGRA'ların;
 - Yorumlanma kriterleri henüz belirsizdir
 - optimal cut-off ?, konversiyon?, reversiyon?
 - Pozitif prediktif değeri düşüktür.

Sağlık çalışanların seri taraması için rehber önerileri

Kanada, Brezilya, G. Kore, S.Arabistan, İrlanda, Avusturya	Sadece TDT
ECDC, İspanya, Bulgaristan,	TDT pozitif ise IGRA
CDC, İsviçre, İtalya (BCG'lilerde tercih IGRA)	TDT veya IGRA
Slovakya, Japonya, İsviçre, Portekiz, Fransa	Sadece IGRA
Avustralya, Norveç, Hırvatistan, Danimarka, İngiltere, Finlandiya, Çek Cumhuriyeti, Almanya	Öneri Yok/ önerilmemekte

ÖZET:

- Çoğu rehber ya **sadece TDT** ya da **iki basamaklı yaklaşımı** önermekte, (BCG durumuna bağlı)
- Bazı rehberler ise **her iki testten birinin** seçilebileceğini belirtmektedir. (BCG'lilerde tercih IGRA)

Aktif TB tanısında IGRA

- Kesin tanı mikrobiyolojik ve moleküler yöntemlerle mümkün.
- Kesin tanının zor olduğu durumlar
 - Mikroskopik incelemede ARB görülemediği,
 - Kültürde üremenin olmadığı,
 - Yeterli/uygun örnek alınamayan durumlar.
- Başlıcaları; akciğer dışı TB ve çocukluk dönemi TB



IGRA ?

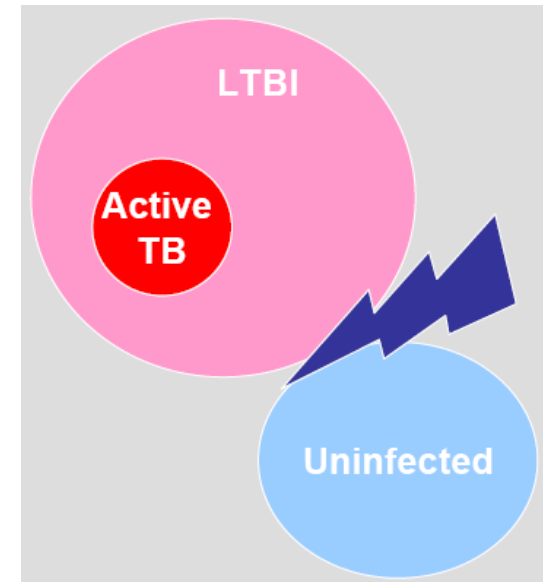
Aktif TB tanısında rehber önerileri

WHO, Kanada, İsviçre, S.Arabistan, Hırvatistan, İrlanda, G.Kore, Brezilya	Erişkinlerde	IGRA kullanılmamalı
WHO, Fransa, İrlanda, G. Kore, Brezilya	Çocuklarda	
ECDC, CDC, İngiltere, Fransa (sadece ekstrapul.TB), Avustralya, Slovakya, Japonya, Hollanda, Norveç, Bulgaristan, Portekiz, Danimarka, Avusturya	Erişkinlerde	Sadece yardımcı bir test olarak IGRA kullanılabilir (bazı rehberlere göre: sadece diğer tanısal testler sonuç vermediğinde)
ECDC, Kanada, ABD (CDC ve AAP), İngiltere, İsviçre, Avustralya, Slovakya, Japonya (> 12y), S.Arabistan, Hollanda, Norveç, Bulgaristan, Portekiz, Danimarka, Avusturya, Hırvatistan	Çocuklarda	
Almanya, İtalya, İspanya, Finlandiya, Polonya, Çek C.		Öneri Yok

Aktif TB tanısında rehber önerileri

ÖZET:

- **IGRA kullanılması önerilmemektedir.**
- Ancak düşük TB insidansı olan ülkelerde,
 - Bazı durumlarda yardımcı bir test olarak kullanılabilir.
 - Diğer tanısal testler ile sonuç alınamadığında.
 - Standart tanısal testlerin yerini almamalı.
 - LTBE ile aktif TB ayırımını yapamadığı unutulmamalıdır



TB tedavisinin takibinde öneriler

- Bazı çalışmalar, aktif TB tedavisini takiben kantitatif IGRA sonuçlarında azalma olduğunu göstermektedir.
- Ancak, kanıtlar yetersizdir.
- **TB tedavisinin takibinde IGRA kullanılması önerilmemektedir.**

Sağlık Bakanlığı IGRA Önerisi

- TDT uygulamasının sürdürülmesi,
- TDT negatif olan (booster ile) ve kuvvetle LTBE olduğu düşünülen, bağışıklığı baskılanmış ya da bağışıklığı baskılayıcı tedavi adayı kişilerde IGRA uygulanması

Sonuç

