

Latent Tüberküloz Enfeksiyonunda Yeni Tanı Yöntemleri

Dr. Nuri ÖZKÜTÜK

Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

KLİMİK 2016 - 30. YIL KURULTAYI
09 – 12 Mart 2016, Belek / Antalya

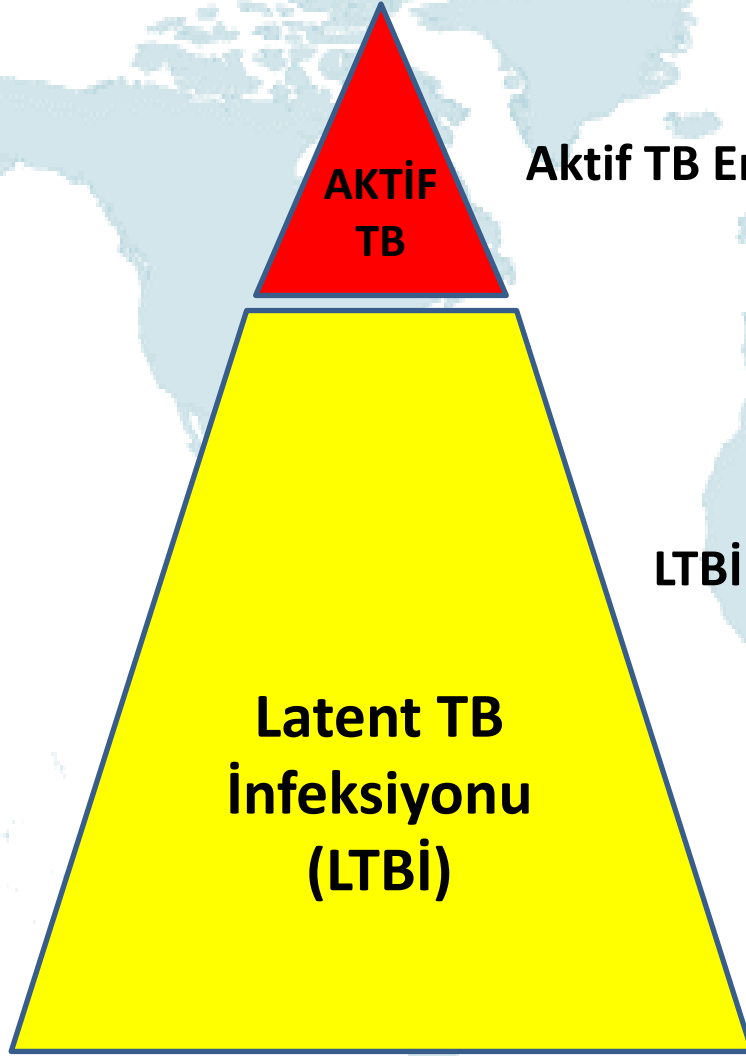
Sunum Planı

- Giriş
- LTBI tanı yöntemleri
- Uygulama alanları
- Öneriler

“Latent TB, tüberküloz hastalığının fideliğidir”

Şeref Özkara'nın UNION 2014
Dünya Akciğer Sağlığı Kongresi notlarından

M. tuberculosis enfeksiyonu



Yüksek TB insidansında

Aktif TB Erken Tanı → Etkili tedavi → TB KONTROLÜ

Düşük TB insidansında

LTBİ Tanı → Koruyucu tedavi → TB KONTROLÜ

LTBİ tanısı

- **Amaç:** aktif TB gelişme riski yüksek olan LTBİ'lilerin koruyucu tedavisinin sağlanmasıdır.
- Mevcut testler, sağlıklı kişilerde aktif TB'a progresyon açısından düşük pozitif prediktif değere sahiptir.



**Tüm toplumun sistematik LTBİ taramasına
gerek yoktur**

**Sadece koruyucu tedaviden yararlanacak kişiler
test edilmelidir**

LTBI kimlerde test edilmeli?

- Test edilmesi gerekenler:
 - Temaslılar (Erişkin ve Çocuklar)
 - HIV infekte kişiler
 - Anti-TNF tedavisi başlanacaklar
 - Diyaliz hastaları
 - Organ veya hematolojik nakil planlananlar
 - Slikozisli hastalar
- Test edilmesi düşünülmesi gerekenler:
 - Sağlık çalışanları
 - Göçmenler
 - Mahkumlar
 - Evsizler
 - Yasadışı ilaç kullananlar

LTBE Tanı Testleri

- Altın standart yöntem yoktur



1910



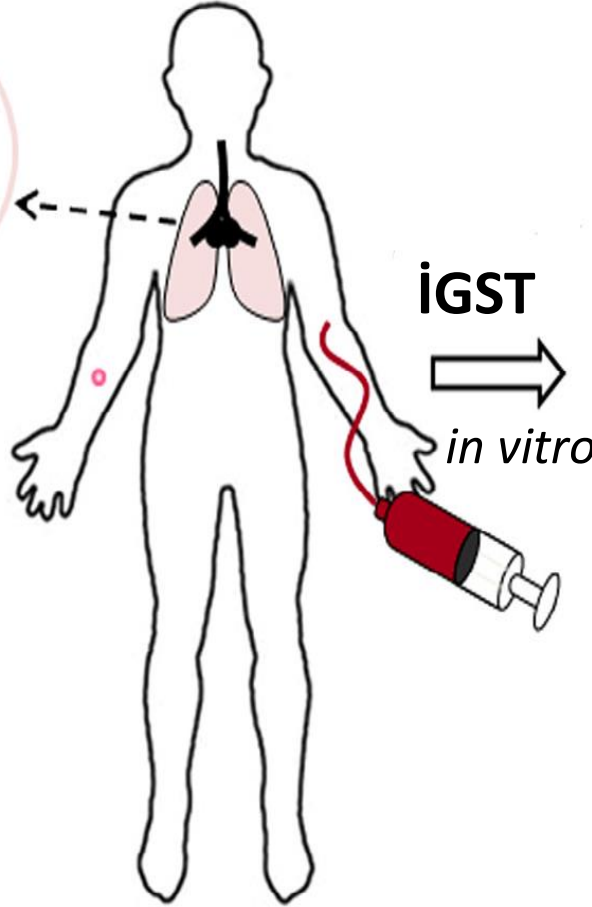
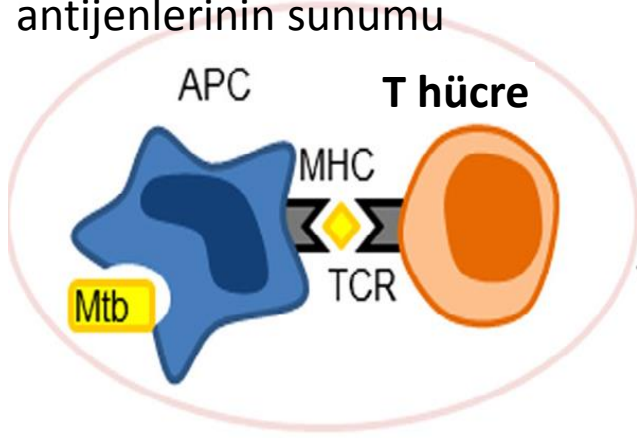
2016



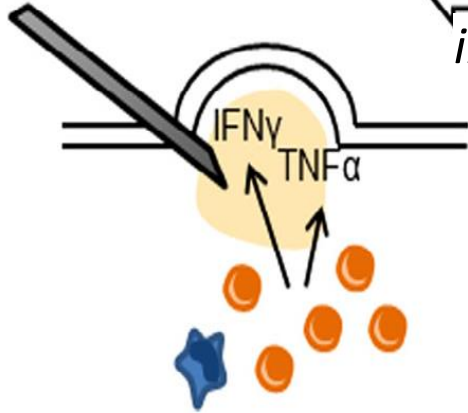
2016<

LTBİ Tanı Testlerinin İmmunolojik Temeli

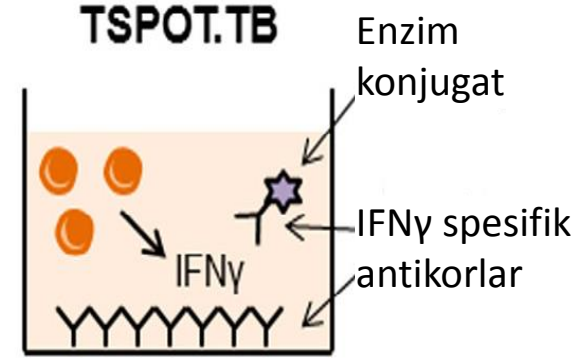
Mikobakteri
antijenlerinin sunumu



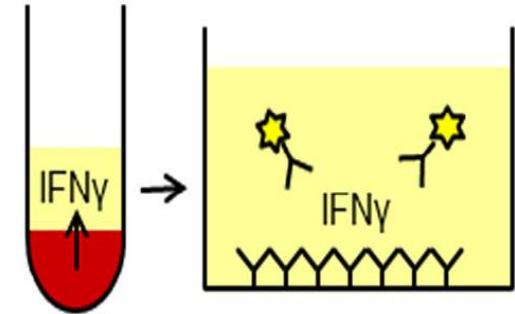
TDT
in vivo



Endurasyon ölçümü



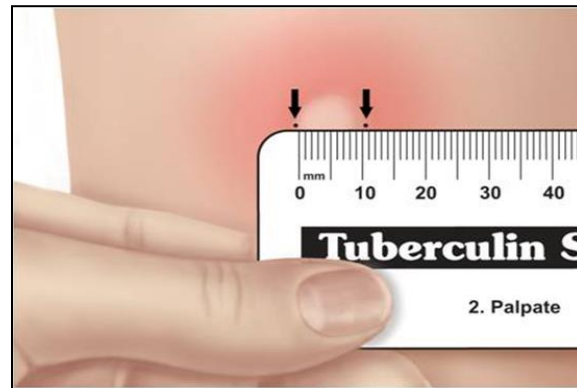
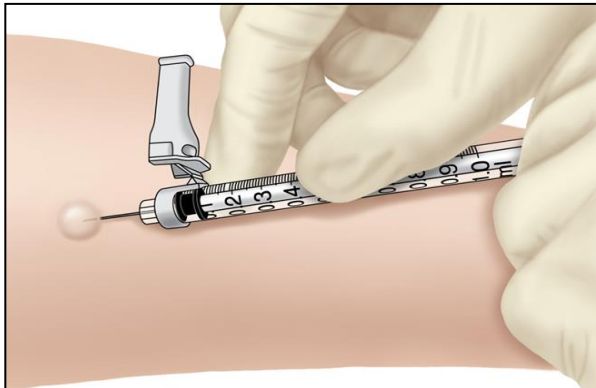
QuantiFERON



IFN- γ üretiminin ölçümü

Tüberkülin Deri Testi (TDT)

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



İnterferon Gama Salınım Testleri (İGST)

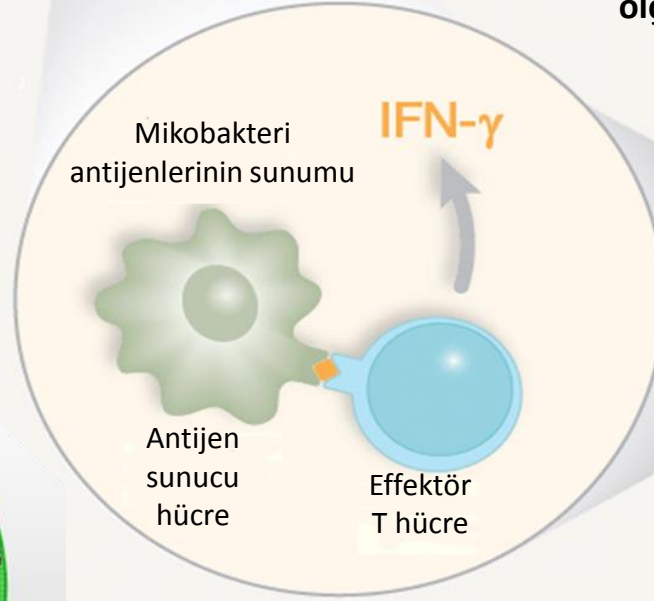
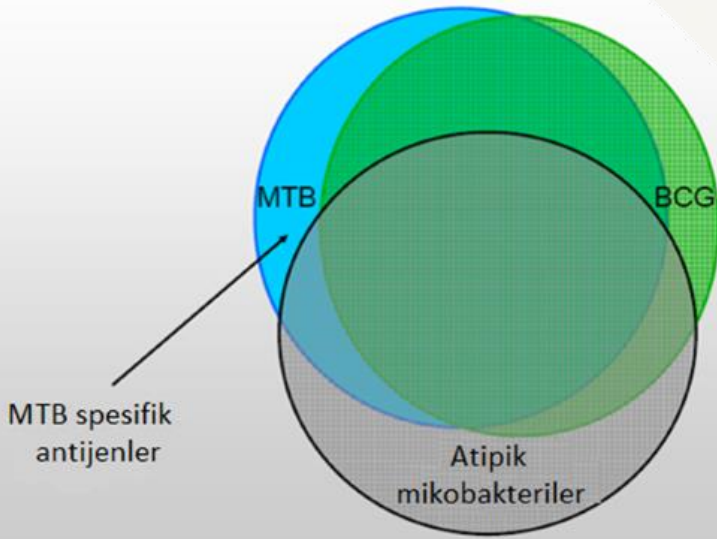
[Interferon-Gamma Release Assay, IGRA]

- TDT'ne alternatif olarak geliştirilmiş T-hücre temelli yöntemler
- *M. tuberculosis*'e özgül antijenlere karşı *in vitro* koşullarda IFN- γ salınımının ölçülmesi prensibine dayalıdır.

MTB'ye spesifik olmayan
PPD'ye yanıtın neden olduğu
endurasyonun ölçülmesi

MTB'ye spesifik antijenlerin
(ESAT-6, CFP-10)
uyardığı
IFN- γ düzeyinin veya
IFN- γ üreten hücrelerin
ölçülmesi

Mikobakteri Antijenleri



İGST - Ticari Kitler

- **QuantiFERON–TB Gold Plus (QFT-Plus)** (Qiagen, Germany)

- Tam kan örneğinde, özgül antijenler ile uyarılan T-hücrelerce salınan **IFN- γ düzeyini** belirler.
- Yöntem; **ELISA**
- Antijen; **ESAT-6, CFP-10**



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

- Periferik kan **mononükleer hücreler** özgül antijenlerle uyarıldığına, **IFN - γ salan T-hücrelerin sayısını** belirler.
- Yöntem; **ELISPOT** “enzyme-linked immunospot assay”
- Antijen; **ESAT-6, CFP-10**

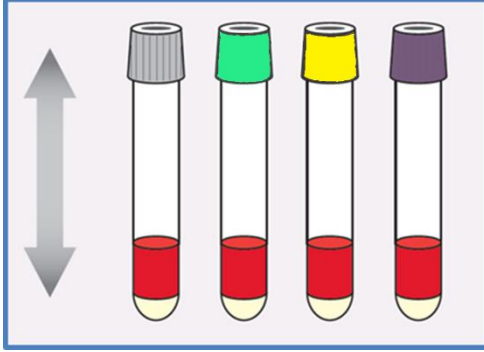


QuantiFERON-TB Gold Plus

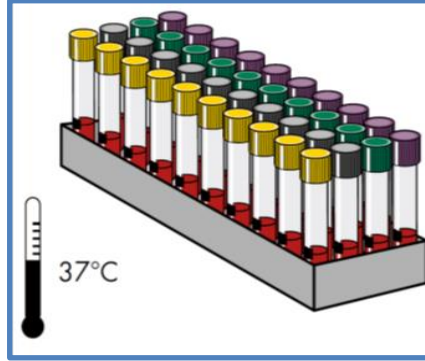
Negatif
Kontrol

ESAT6
CFP10

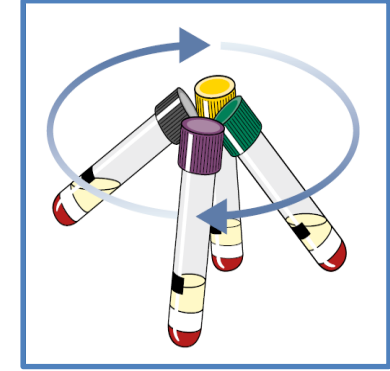
Pozitif
Kontrol



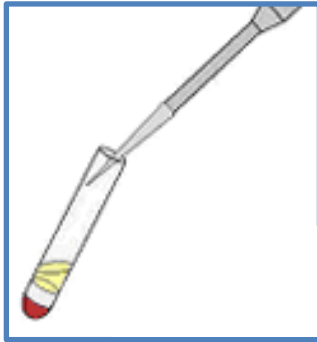
Kanın özel tüplere alınıp,
çalkalanması (X10)



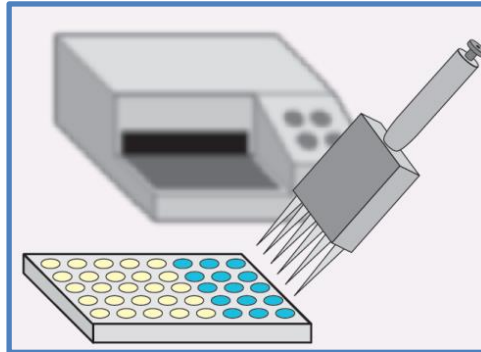
inkübasyon
(37°C'de 16-24h)



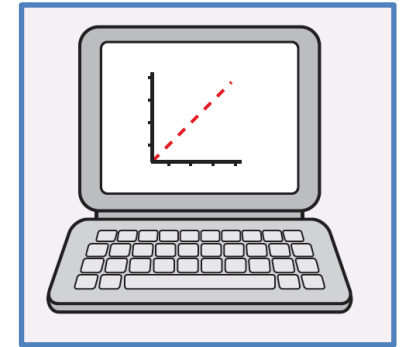
Santrfüjleme



Plazmanın
toplanması

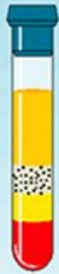


ELISA

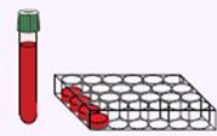


Analiz

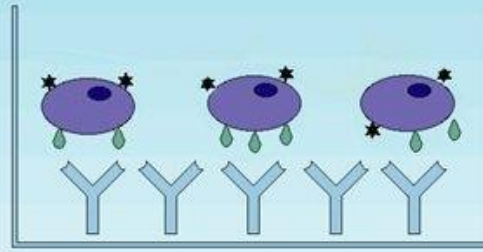
T-Spot TB



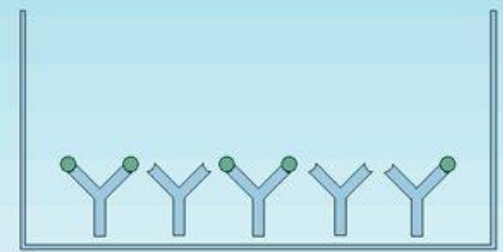
— plazma
— PNL
— Jel bariyer
— eritrosit



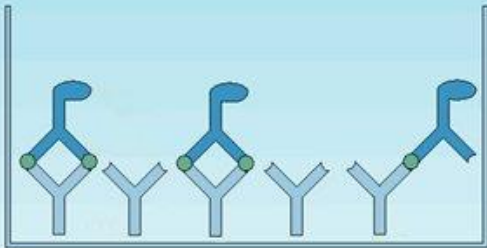
Kandan elde edilen lökositlerin ve antijenlerin **Anti-IFN- γ** antikor kaplı kuyucuklara eklenmesi.



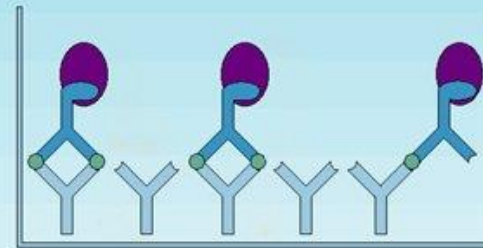
İnkübasyon
(37°C'de, 16-20 h)
T lenfositlerden IFN- γ salınımı.



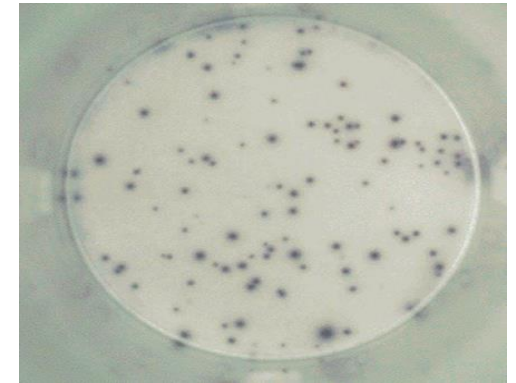
IFN- γ 'nın antikora bağlanması



İşaretili anti-IFN- γ eklenmesi



Substrat eklenmesi,
spotların gözle veya okuyucu ile
sayılması



Her bir spot
IFN- γ üreten bir T lenfositini
simgeler

TDT ve İGST'lerin Karşılaştırması

	TDT	QFT	T-SPOT.TB
Yöntem	İn vivo deri testi	ELISA	ELISPOT
Örnek	Deri içi enjeksiyon	Tam kan	Periferik MNL
Antijen	PPD	ESAT-6, CFP-10	ESAT-6, CFP-10
Sonuç	Endürasyon çapı (mm)	IFN- γ miktarı (IU/ml)	Spot oluşturan birim
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

LTBİ Tanı Testlerinin Kısıtlılıkları

- LTBİ ve Aktif TB ayırımı yapamazlar
- Aktif hastalığa progresyon öngörülleri düşük
- Duyarlılık düşük
 - Küçük çocuklarda
 - İmmun yetmezliklilerde

LTBİ Tanısında Yeni Yöntem Arayışları

- I. İGST'ler için yeni antijenler
- II. Farklı sitokinler
- III. T-hücre sitokin profili ve fenotip profili belirleme



I. Yeni antijenler

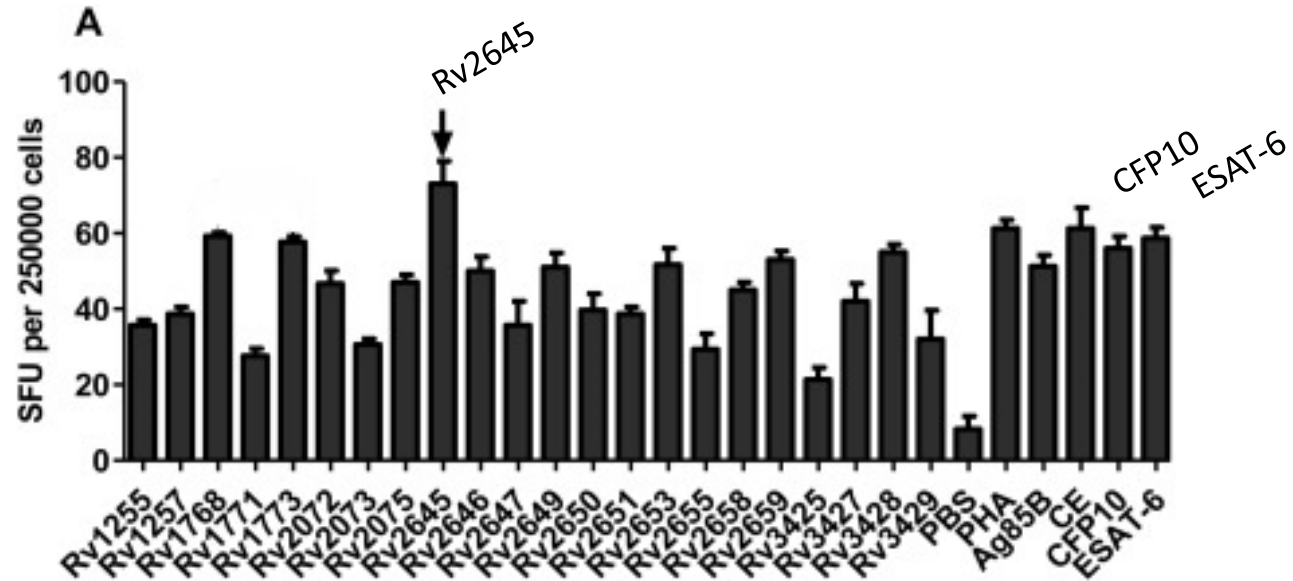
- Mtb'ye özgül yeni antijenler
 - İGST'nin duyarlılığını artırabilir?
 - Aktif TB'a progresyonun öngörülmesinde faydalı olabilir?
 - LTBi ile aktif hastalığın ayırımında kullanılabilir?
- Gelecek nesil İGST'ler için aday antijenler;
 - Rv3879c
 - Rv3615c (EspC)
 - Rv2645
 - Rv2031c
 - Rv3873
 - Rv2626c

}	Duyarlılığı ↑
}	Aktif TB'a progresyon öngörüsünü ↑
}	LTBi / Aktif TB ayırım gücünü ↑

Identification of a novel immunodominant antigen Rv2645 from RD13 with potential as a cell-mediated immunity-based TB diagnostic agent

Journal of Infection 2015; 71: 534-43

Wei Luo^a, Zi-Lu Qu^a, Yan Xie^a, Jie Xiang^b, Xiao-Lian Zhang^{a,*}



Rv2645 antijenin;

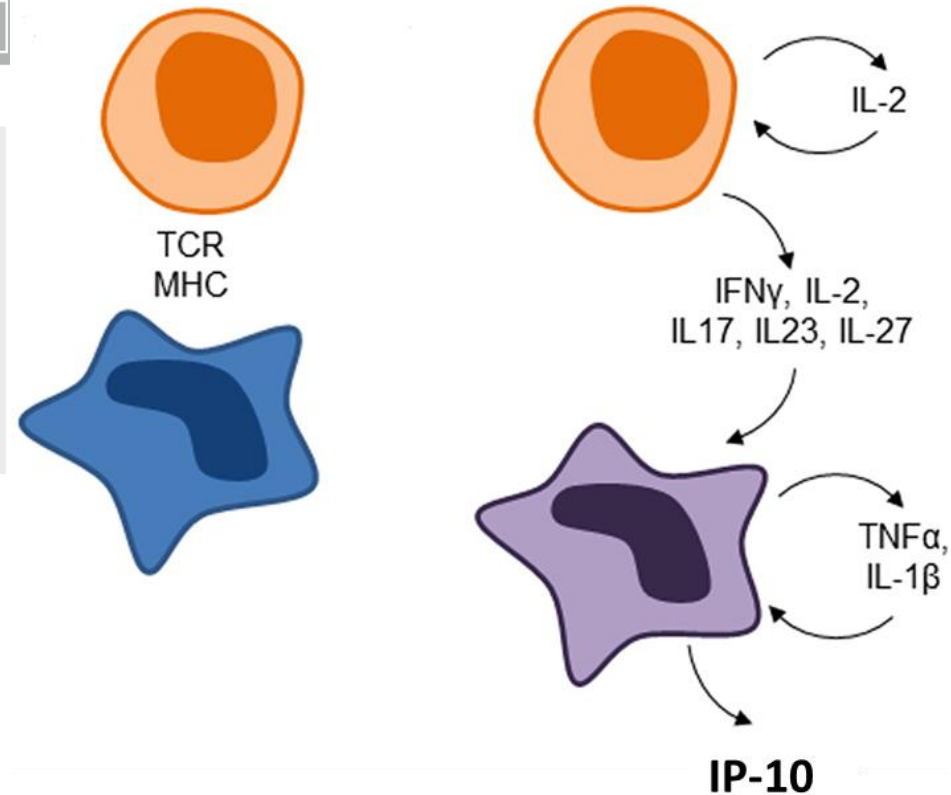
- CFP10 ve ESAT-6 kadar IFN- γ yanıtına neden olduğu ve
- MTB spesifik olduğu gösterilmiştir.
- Tanısal olarak kullanılabileceği iddia edilmiştir.

II. Yeni sitokinler

- IFN- γ 'ya ilave başka sitokinlerin ölçümü duyarlılığı artırabilir?
- Aday sitokinler;
 - IFN- γ inducible protein -10 (IP-10),
 - Monocyte chemotactic protein -2 (MCP-2)
 - Monokine inducible protein (MIG)

IP-10 release assays in the diagnosis of tuberculosis infection: current status and future directions

Expert Rev. Mol. Diagn. 12(2), 175–187 (2012)



- IFN- γ ile birlikte IP-10 ölçümünün test duyarlılığını artırabilir.
- Küçük çocuklarda ve CD4 sayısı düşük HIV ile infekte kişilerde T-hücre temelli TB enfeksiyonu tanısını iyileştirebilir.

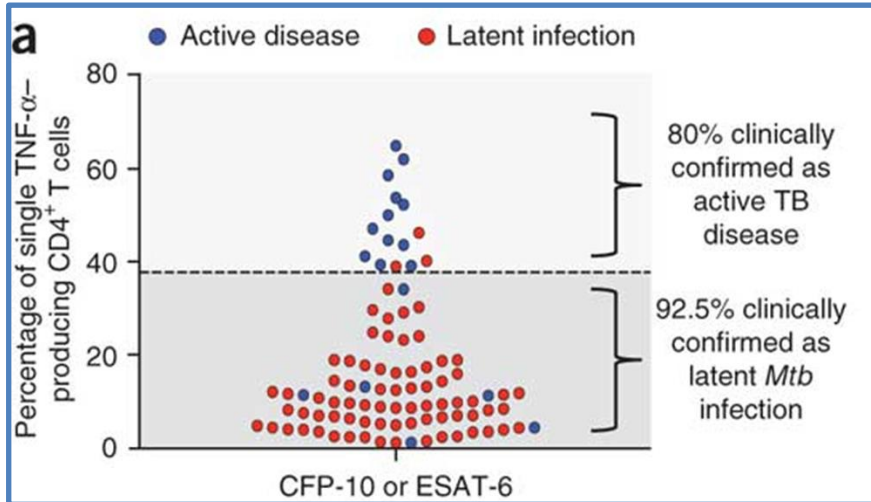
III. T hücre fenotipi belirleme

- a. Sitokin hakimiyetine göre fenotip belirleme**
- b. Hücre yüzey belirteçlerine göre fenotip belirleme**

III.a. Sitokin hakimiyetine göre T hücre fenotipi

Sitokin profiline göre CD4 T hücre alt grupları;

- Sadece IFN- γ üreten T efektör hüç.
 - Sadece TNF α üreten T efektör hüç.
- } Yüksek antijen yükü → Aktif TB ile uyumlu
- Sadece IL-2 üreten T santral bellek hüç.
 - IFN- γ ve IL-2 üreten T efektör bellek hüç.
- } Düşük bakteriyel yük → LTBi ile uyumlu



Nat. Med. 17 (3) (2011) 372–6

Sonuç;

IFN- γ 'a ilave olarak IL-2 ve TNF α ölçümü, LTBi ile aktif TB ayırımında yararlı olabilir.

Methods 61 (2013) 52–62

Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014; 33: 2111–9

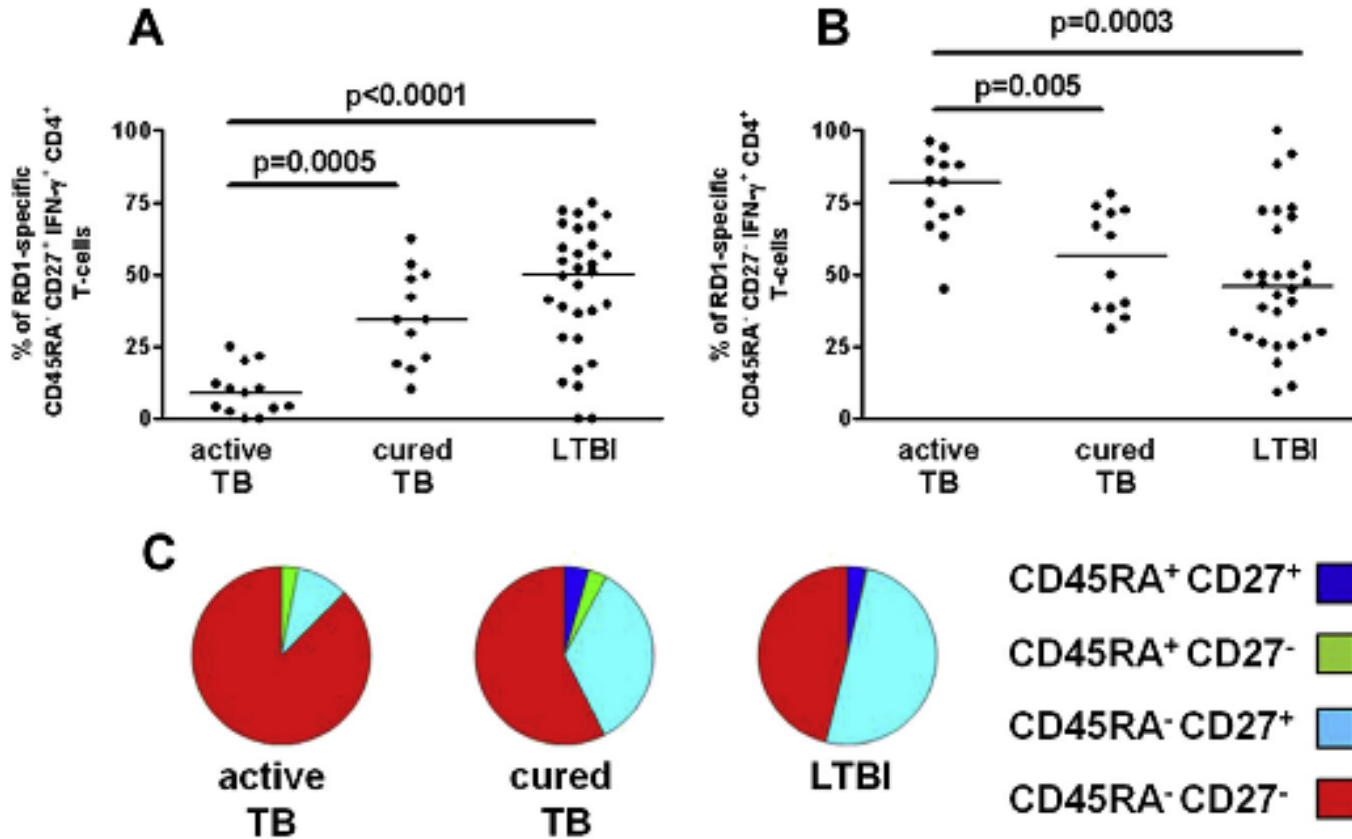
III.b. Hücre yüzey belirteçlerine göre T hücre fenotipi

- Hücre yüzey belirteçleri;
 - CD27, CD4Ra, CCR7, CD42L, IL-7 α R,
- Yöntemler;
 - Flowsitometrik analiz
 - FLISpot (fluorescence-linked immunospot assay)
- Tanısal bir test olarak kullanılabilir?

Assessment of CD27 expression as a tool for active and latent tuberculosis diagnosis

Journal of Infection (2015) 71, 526–533

Elisa Petruccioli^a, Linda Petrone^a, Valentina Vanini^a,



- CD27 eksprese eden Mtb-spesifik CD4 T hücre hakimiyetinin LTBI ile uyumlu olduğu,
- Rutin kullanım için bir belirteç olabileceği gösterilmiştir

Diğer Arayışlar

- Proteomikler

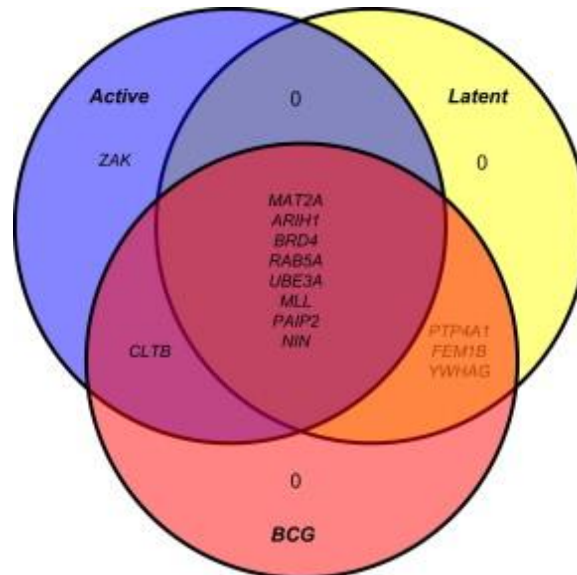
- Kütle spektrometrisi ile LTBI'de 14 farklı biyobelirteç bulunmuştur

Diagn Microbiol Infect Dis, 79 (2014) 432–437

- Transkriptomikler

- Mikroarray analiz ile gen ekspresyonu paterlerinin belirlenmesinin LTBI/aktif TB ayırımı yapılabileceği gösterildi

Tuberc (Edinb) 2011;91(5):390-9.



LTBi tanısında test seçimi ve öneriler

TDT'nin kullanılmasının önerildiği tüm durumlarda
IGST'ler kullanılabilir.

MMWR Recomm Rep 2010; 59 (No. RR-5) 1-25



Erişkin temaslı taramasında öneriler

- **Düşük ve orta gelirli ülkelerde;**
 - TDT yerine **İGST** kullanılmamalıdır
- **Yüksek gelirli veya TB insidansı 100/100000'in altında olan üst-orta gelirli ülkelerde;**
 - **TDT veya İGST** kullanılabilir

WHO/HTM/TB/2015.01

- **CDC;** TDT veya İGST kullanılabilir
 - BCG'lilerde ve geri dönme olasılığı düşük olanlarda İGST tercih edilmeli
- **ECDC;** **pozitif TDT'yi takiben İGST** gereksiz koruyucu tedavileri azaltır

Çocuklarda LTBI tanısında öneriler



- Özellikle çok küçük çocuklar için veriler sınırlı.
- **Çocuklarda İGST ve TDT benzer doğruluğa sahip**
 - Bu grupta TDT ve İGST'lerin yalancı negatiflikleri daha sık
 - <5 yaş çocuklarda immunulojik maturasyon yetersiz
 - Bu grupta hiçbir test tek başına LTBI'nu ekarte etmez

Interferon- γ Release Assay for the Diagnosis of Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Children Younger Than 5 Years: A Meta-Analysis

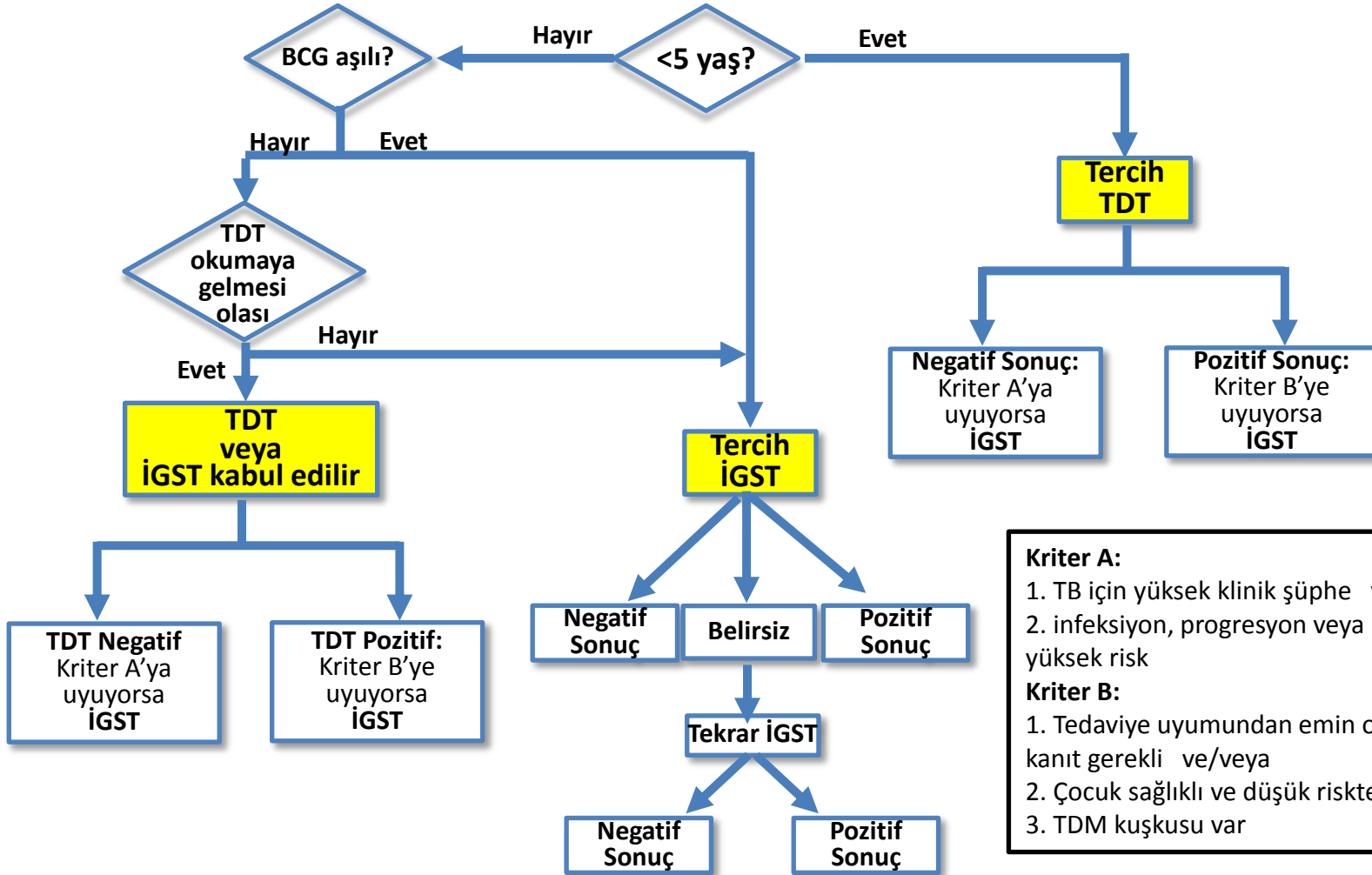
Long Ge, BS^{1,2}, Ji-Chun Ma, BS^{1,2}, Min Han, BS^{1,2}, Jin-Long Li, BS^{1,2}, and Jin-Hui Tian, PhD²

respectively. *Conclusion.* This meta-analysis showed that the sensitivity and specificity of IGRAs were slightly higher than TST and can be used as supporting tools to detect LTBI in children younger than 5 years. The methodological quality of diagnostic test needs to be improved.

- Beş yaşından küçük çocuklarda LTBI saptanmasında İGST'ler yardımcı olarak kullanılabilir

TECHNICAL REPORT

Interferon- γ Release Assays for Diagnosis of Tuberculosis Infection and Disease in Children



Çocuklarda TDT ve IGST kullanım algoritması.

Algoritma giren çocuğun TB enfeksiyonu için en az bir risk faktörü olduğu varsayılır.



Çocuklarda TDT ve İGST önerileri

- **TDT tercih edilir**
 - 5 yaş altındakiler^a
- **İGST tercih edilir, TDT kabul edilebilir**
 - 5 yaş ve üzeri BCG aşıları çocuklar
 - 5 yaş ve üzeri TDT okumasına gelmesi olası olmayanlar
- **İki basamaklı uygulamanın düşünülmesi gereken durumlar**
 - İlk ve tekrar İGST sonucu belirsiz/geçersiz
 - İlk test (TDT veya İGST) sonucu negatif ve;
 - TB hastalığı klinik kuşkusu var^b
 - Çocuk bir TB risk faktörüne sahip ve progresyon ve kötü gidiş için yüksek riskte (özellikle TNF antogonisti gibi bir immunomodülatör ajan tedavisi)
 - İlk TDT pozitif ve;
 - 5 yaş ve üzeri BCG aşılama öyküsü olan
 - Tedavi ile uyumu artırmak için ek kanıta gereksinim olan

^a Bazı uzmanlar 2-4 yaş arasında İGST kullanır (özellikle BCG aşıları, fakat diğer önemli risk faktörleri yoksa). Çoğu uzman 2 yaşın altında İGST kullanmaz, çünkü bu yaş grubunda veriler yetersiz ve hastalığa progresyon riski yüksektir.

^b Herhangi bir testin pozitif sonucu bu grup için önemli kabul edilir

İmmun yetmezlikli kişilerde

- İmmun yetmezliklilerde TDT ve İGST'lerin duyarlılıkları düşüktür.
 - TDT'nin anerjisine sık rastlanmakta, yalancı negatif sonuçlar alınabilmektedir.
 - İGST'lerde de yalancı negatif ve belirsiz sonuçlarda artış olabilmektedir.
 - Ör. AIDS hastalarında CD4 <200 ise
 - Testler arası duyarlılık farkları az
 - **T-SPOT-TB → ~ % 70 > QFT-GIT → ~ % 60**

HIV infeksiyonlularda öneriler



- **DSÖ → TDT** kullanımını tercih etmektedir
 - Diğer rehberler (CDC, ECDC) → duyarlılığı artırmak için
 - **her iki testin eş zamanlı (İGST+TDT) kullanılmasını** veya
 - **ardışık test** önermektedir
 - Bu grupta negatif İGST sonuçlarının LTBI'unu ekarte etmeyeceği unutulmamalıdır
-
- **TNF α blokeri** kullananlarda da benzer yaklaşım önerilmektedir.

Sağlık çalışanların seri taramasında öneriler



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

Interferon-gamma release assays for tuberculosis screening of healthcare workers: a systematic review

Thorax 2012; 67:62-70

- 50 araştırma, 5 tanesi yüksek insidanslı bölgelerde yapılmış
 - İşe başladığı zaman yapılan ve tekrarlanan testlerin sonuçları karşılaştırılmış
- Yüksek insidanslı bölgelerde TDT/İGST sonuçları arasında fark yok
- Düşük/Orta insidanslı bölgelerde İGST pozitifliği daha düşük;
 - İlaçla koruma endikasyonu azalır ve maliyet etkindir ?

Interferon- γ Release Assays and Tuberculin Skin Testing for Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in Healthcare Workers in the United States

Am J Respir Crit Care Med 2014;189(1):77–87.

- ABD’de sağlık çalışanlarında, İGST ile konversiyon oranları TDT’den çok daha yüksek görülmüş

Sağlık çalışanların seri taraması için rehber önerileri

- Çoğu rehber;
 - **Sadece TDT** önermektedir
- Bazı rehberler ise;
 - **iki basamaklı yaklaşım** (BCG durumuna bağlı)
 - **her iki testten biri** (BCG'lilerde tercih İGST)

Ulusal Tüberküloz Tanı Rehberinin LTBİ Tanısında İGST Önerisi

- Temaslı taramasında TDT kullanılmalı
- LTBİ tanısında İGST tek başına kullanılmamalı
 - TDT ile birlikte İGST'nin önerildiği durumlar:
 - Bağışıklığı baskılananlarda koruyucu tedavi kararı için
 - TNFalfa blokeri kullanmadan önce
 - Organ transplantasyonundan önce
 - Kronik böbrek yetmezliği olanlar
 - Yüksek doz (15 mg/kg, uzun süreli) steroid kullanımı öncesi
 - Hematolojik malignite nedeniyle kemoterapi başlanacaklar
 - Bağışıklık yetmezlikli kişilerde (HIV pozitifler)

Sonuç Olarak;



- LTBI tanısında;
 - Yüksek insidanslı ve düşük gelirli ülkelerde TDT önceliklidir
 - Düşük insidanslı ve yüksek gelirli ülkelerde TDT veya İGST tercih edilebilir