

İGST Prensipleri ve Yeni Kuşak İGST'ler

Dr. Nuri ÖZKÜTÜK

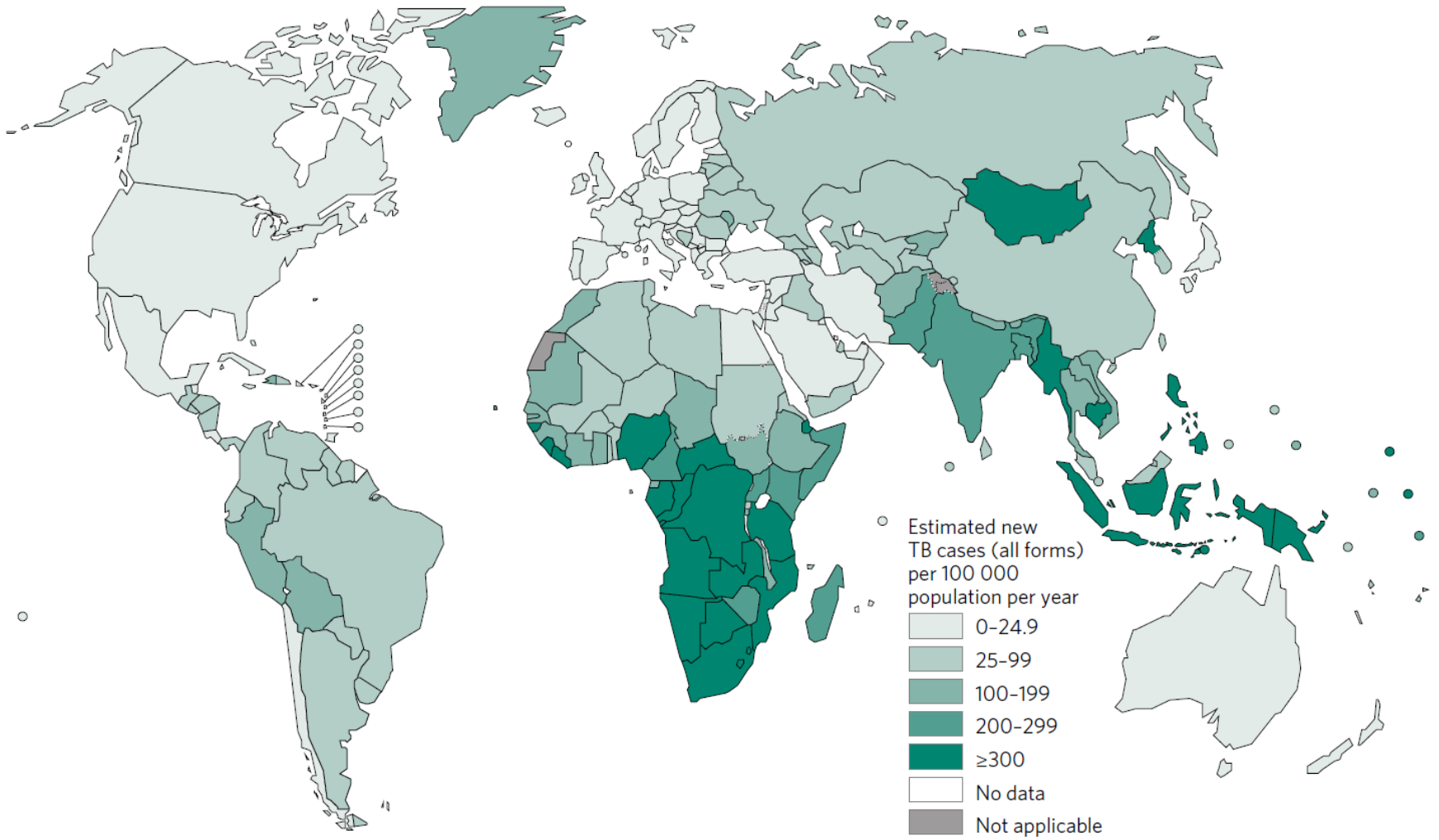
Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

KLİMİK Derneği Çalışma Grupları Olgu Tartışmaları: Latent Tüberküloz Enfeksiyonu (LTBİ):
Tanı ve Tedavide Güncel Yaklaşımlar
11 Mayıs 2017/ İstanbul

Sunum Planı

- Giriş- LTBi
- İGST'ler ve prensipleri
- Yeni arayışlar



Tahmini TB insidans oranları



AKTİF
TB

The image shows a large iceberg floating in the ocean. The small tip of the iceberg is above the water line, while the vast majority of the iceberg is submerged below the surface. This visual metaphor represents the relationship between active TB and latent TB infection (LTBI).

Latent TB infeksiyonu
(LTBi)

Yüksek TB insidansında

Aktif TB Erken Tanı → Etkili tedavi → **TB KONTROLÜ**

Düşük TB insidansında

LTBi Tanı → Koruyucu tedavi → **TB KONTROLÜ**

“Latent TB,
tüberküloz hastalığının fideliğidir”

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**

LTBİ 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

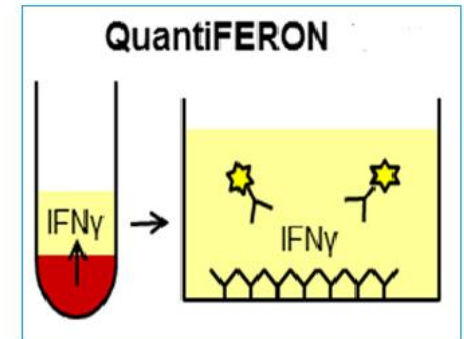
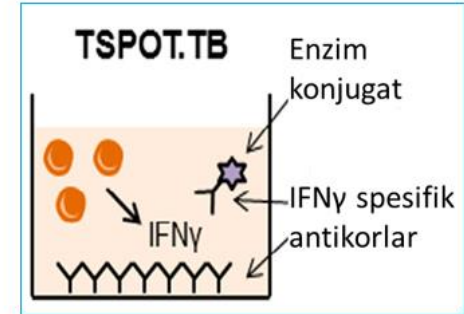
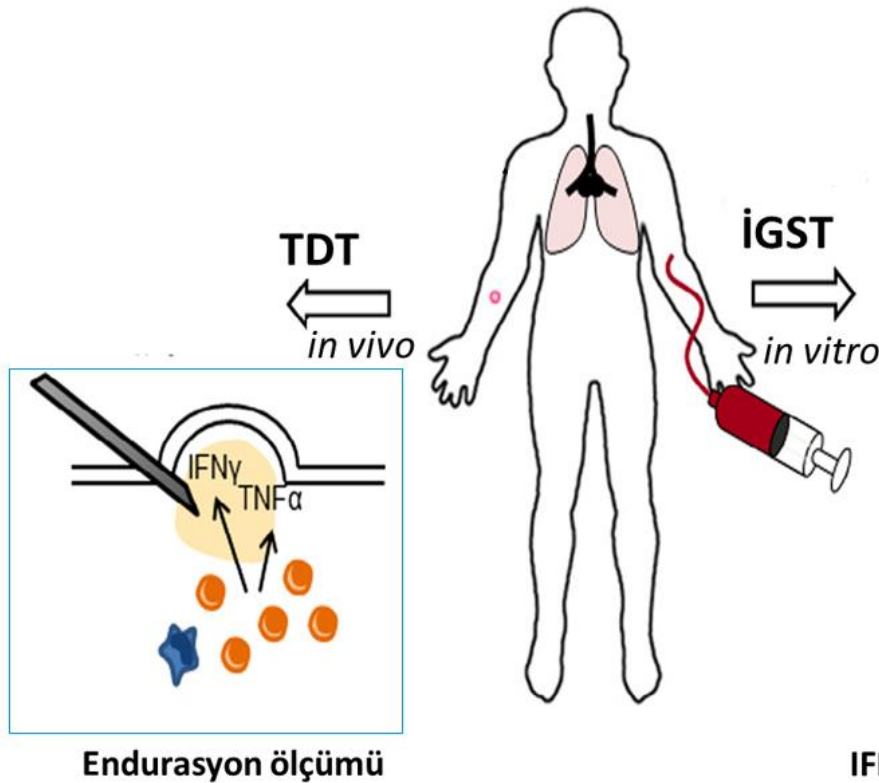
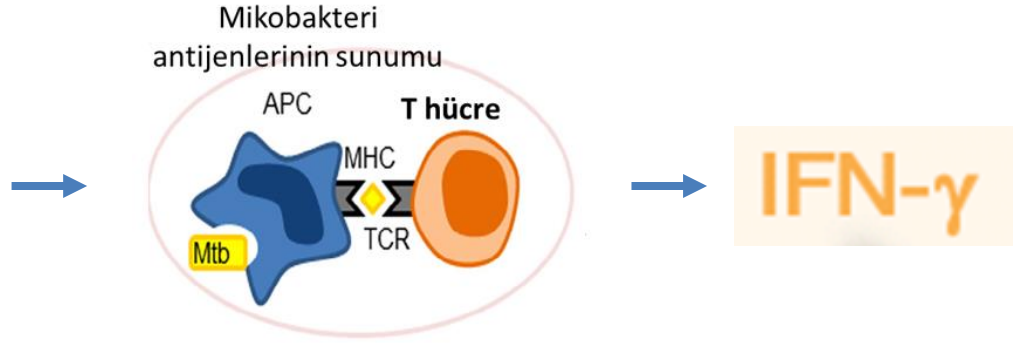
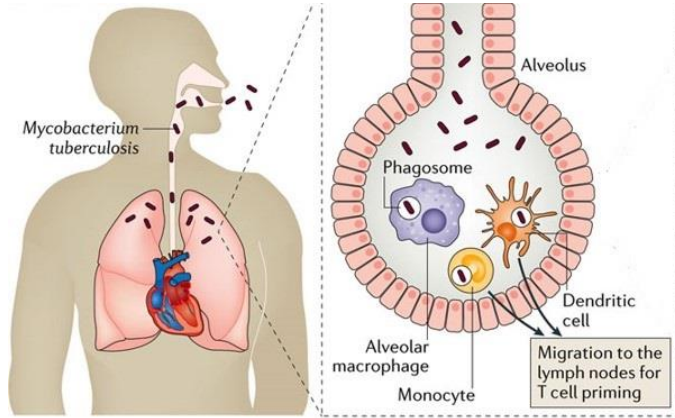


2017



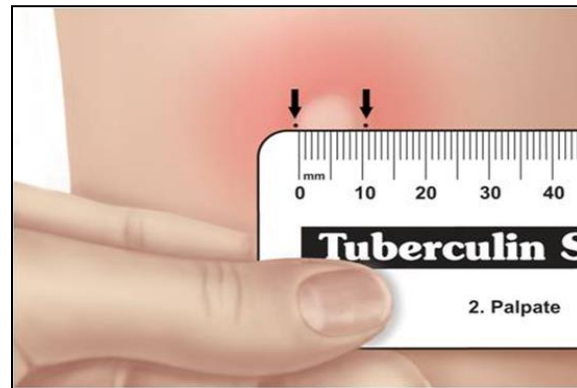
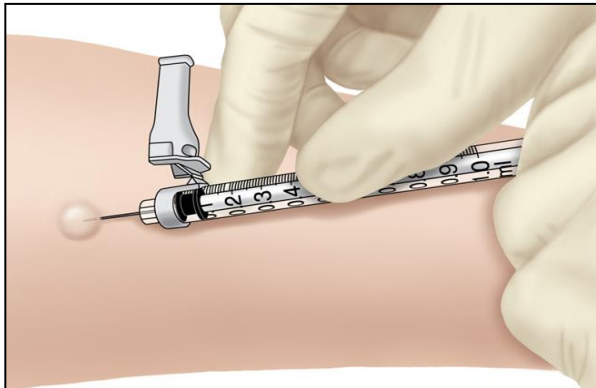
2017<

LTBİ Tanı Testlerinin İmmunolojik Temeli



Tüberkülin Deri Testi (TDT)

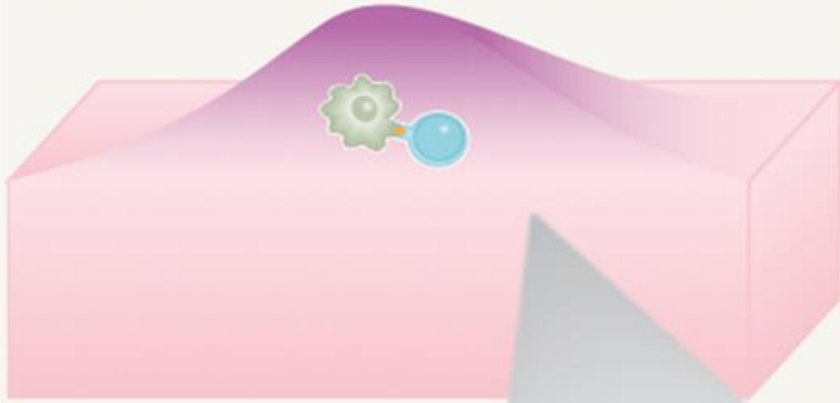
- Antijen: **PPD**
 - *MTBC*'e ait çok sayıda antijenin bir karışımıdır
 - *M. bovis* BCG ve pek çok TDM için de **ortaktır**.
- **Yanlış pozitif** sonuçlar
 - BCG ile aşılananlarda
 - TDM ile infekte olanlarda
- Uygulama ve değerlendirmede de hatalar görülebilir.



İnterferon Gama Salınım Testleri (İGST)

[Interferon-Gamma Release Assay, IGRA]

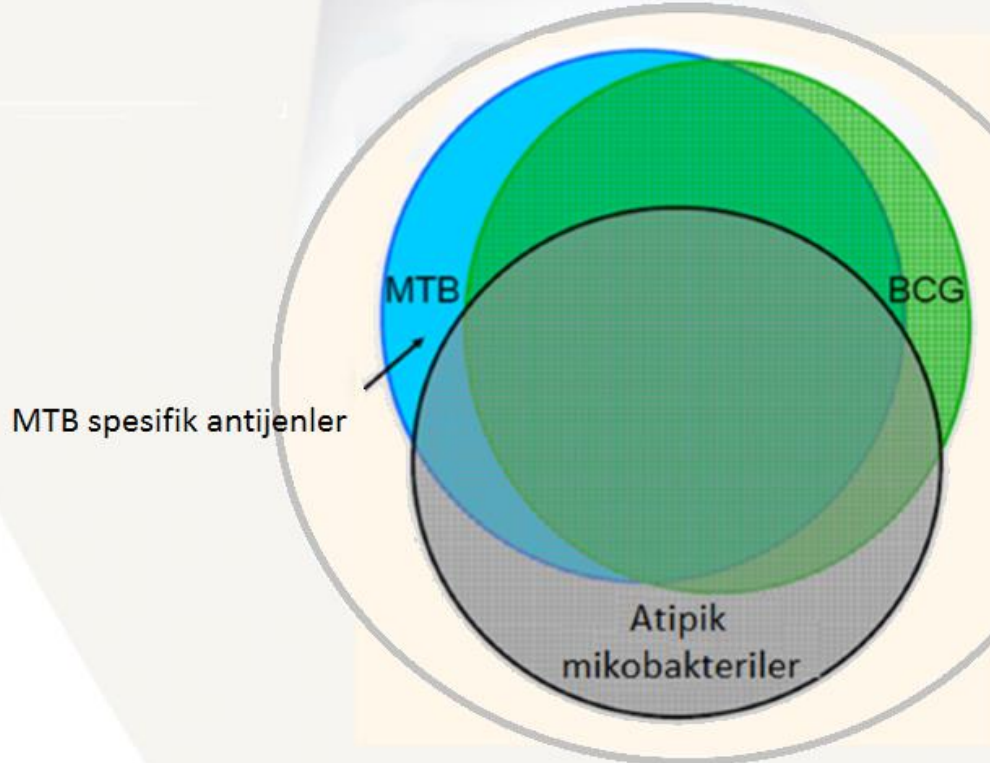
- TDT'ne alternatif olarak geliştirilmiş T-hücre temelli yöntemler
- *M. tuberculosis*'e özgül antijenlere karşı *in vitro* koşullarda IFN- γ salınımının ölçülmesi prensibine dayalıdır.



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**

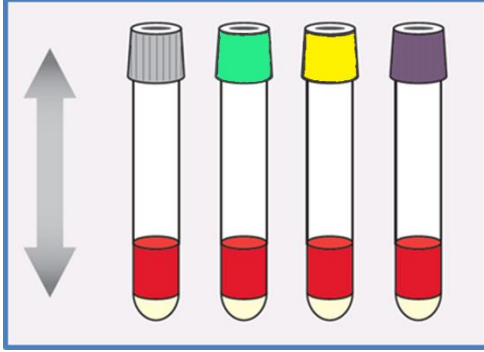


QuantiFERON-TB Gold Plus

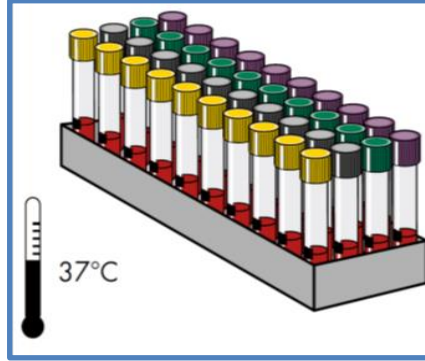
Negatif
Kontrol

ESAT6
CFP10

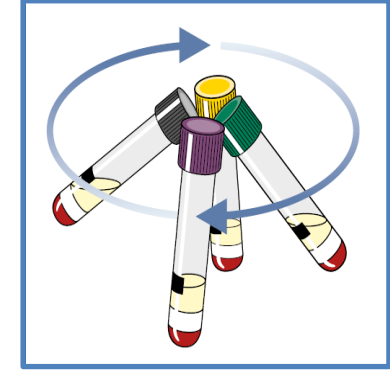
Pozitif
Kontrol



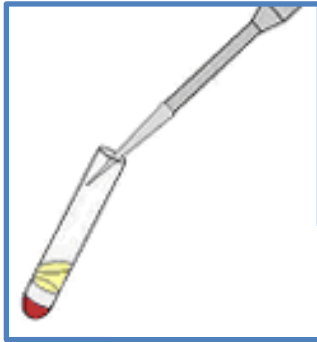
Kanın özel tüplere alınıp,
çalkalanması (X10)



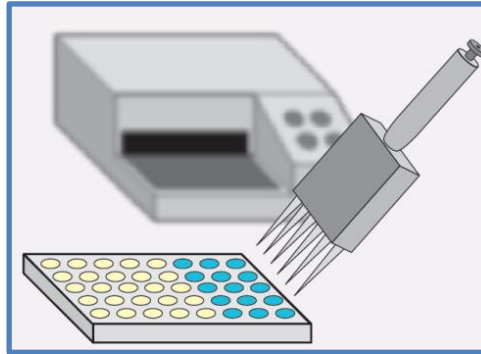
inkübasyon
(37°C'de 16-24h)



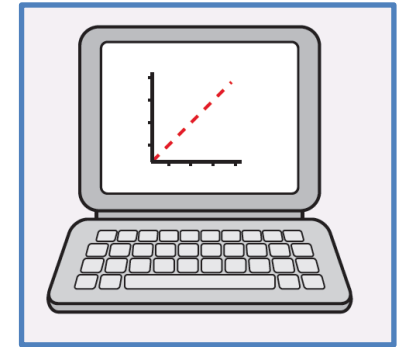
Santrfüjleme



Plazmanın
toplanması

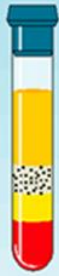


ELISA

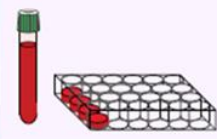


Analiz

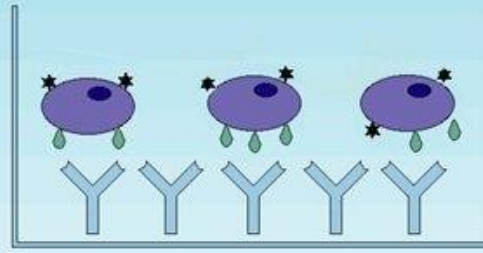
T-Spot TB



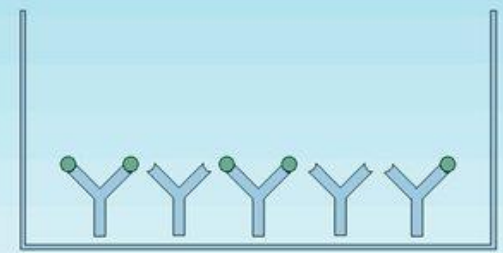
— plazma
— PNL
— Jel bariyer
— eritrosit



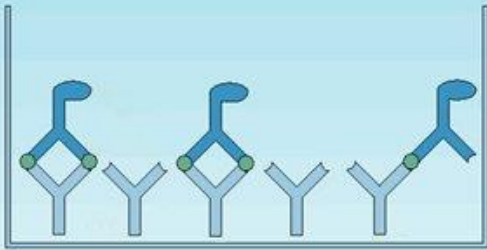
Kandan elde edilen lökositlerin ve antijenlerin **Anti-IFN- γ** antikor kaplı kuyucuklara eklenmesi.



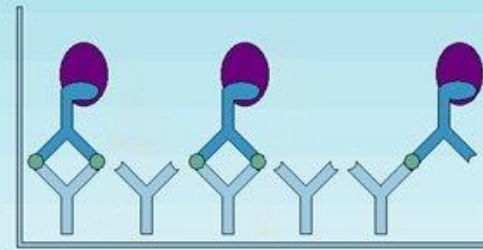
İnkübasyon
(37°C'de, 16-20 h)
T lenfositlerden IFN- γ salınımı.



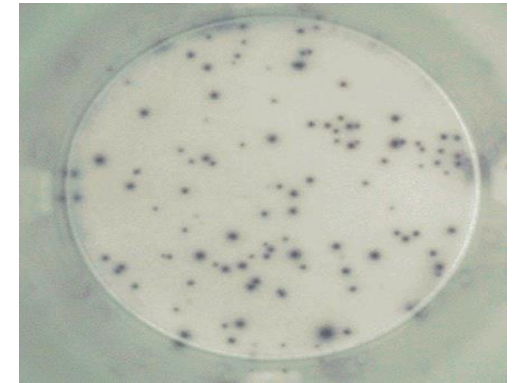
IFN- γ 'nın antikora bağlanması



İşaretili anti-IFN- γ eklenmesi



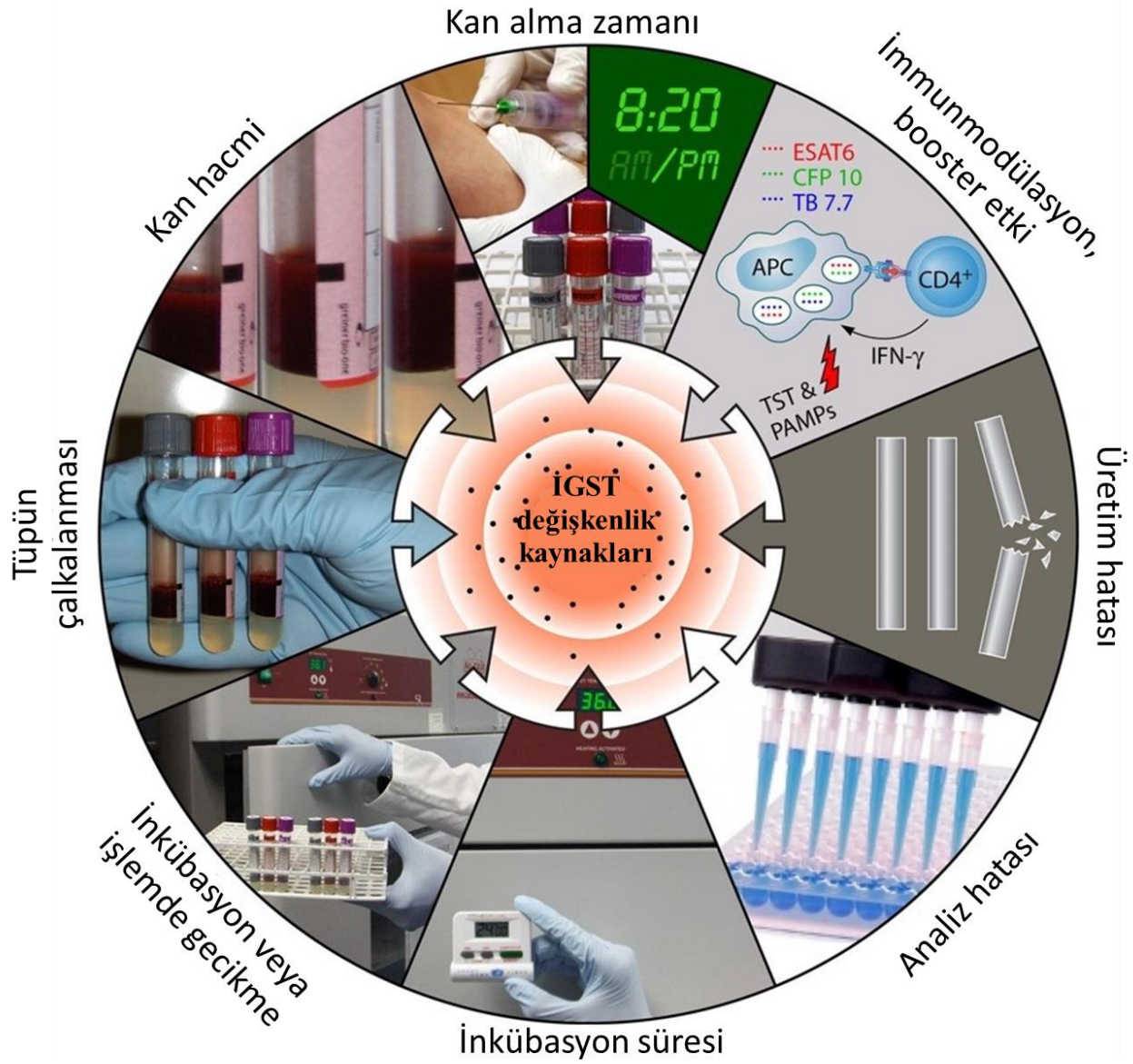
Substrat eklenmesi,
spotların gözle veya okuyucu ile
sayılması

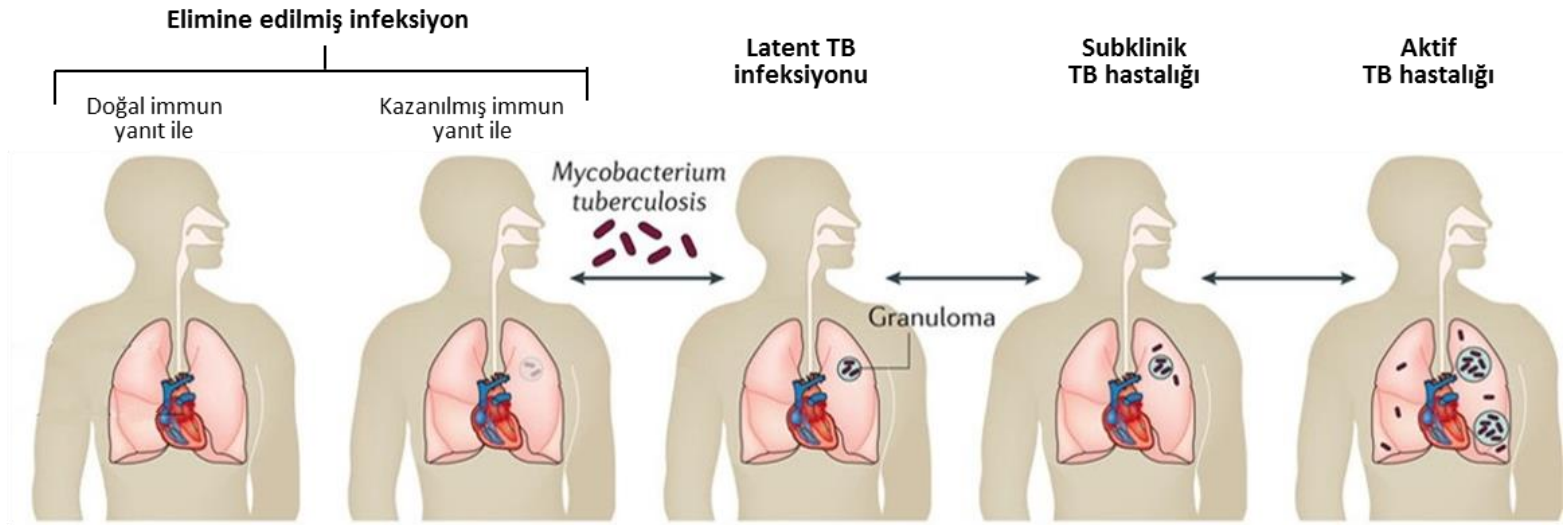


Her bir spot
IFN- γ üreten bir T lenfosit
simgeleri

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 vizit 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





TDT	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Çoğunlukla pozitif
İGST	Negatif	Pozitif	Pozitif	Pozitif	Çoğunlukla pozitif
Kültür	Negatif	Negatif	Negatif	Aralıklı pozitif	Pozitif
Balgam yayması	Negatif	Negatif	Negatif	Çoğunlukla negatif	Pozitif veya negatif
Bulaştırıcılık	Yok	Yok	Yok	Sporadik	Var
Semptomlar	Yok	Yok	Yok	Yok veya hafif	Hafif - ciddi
Önerilen tedavi	Yok	Yok	Koruyucu tedavi	Multidrug tedavi	Multidrug tedavi

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

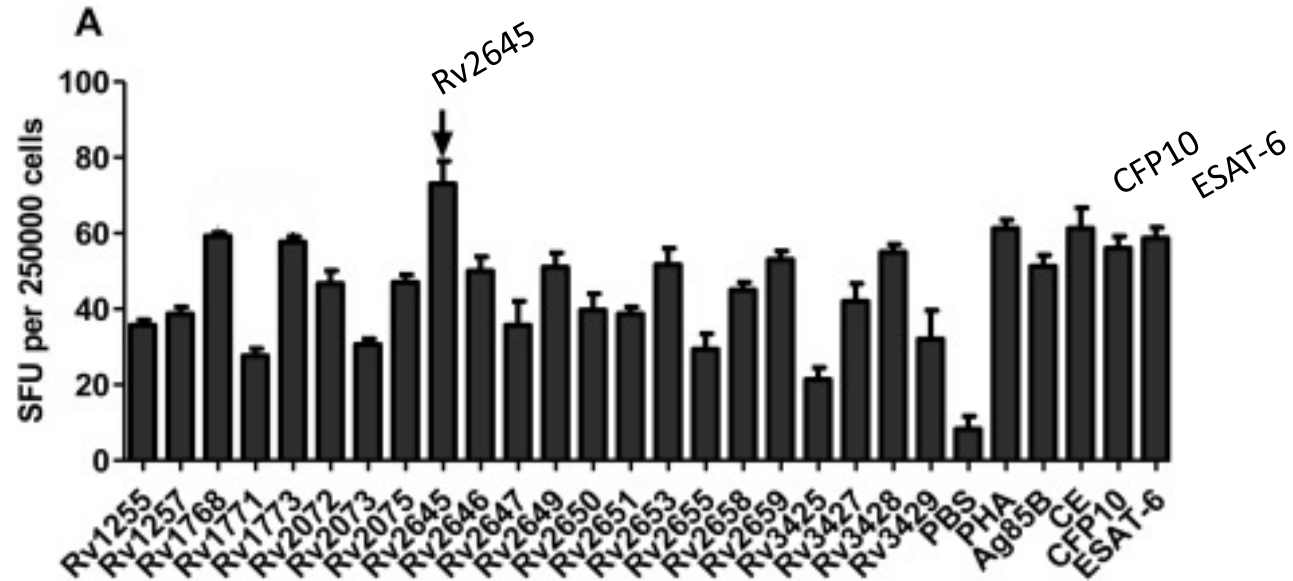
- Mtb'ye özgül yeni antijenler
 - İGST'nin duyarlılığını artırabilir?
 - Aktif TB'a progresyonun öngörülmesinde faydalı olabilir?
 - LTBi ile aktif hastalığın ayırımında kullanılabilir?
- Gelecek nesil İGST'ler için aday antijenler;
 - Rv3879c
 - Rv3615c (EspC)
 - Rv2645
 - Rv2031c
 - Rv3873
 - Rv2626c

}	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;

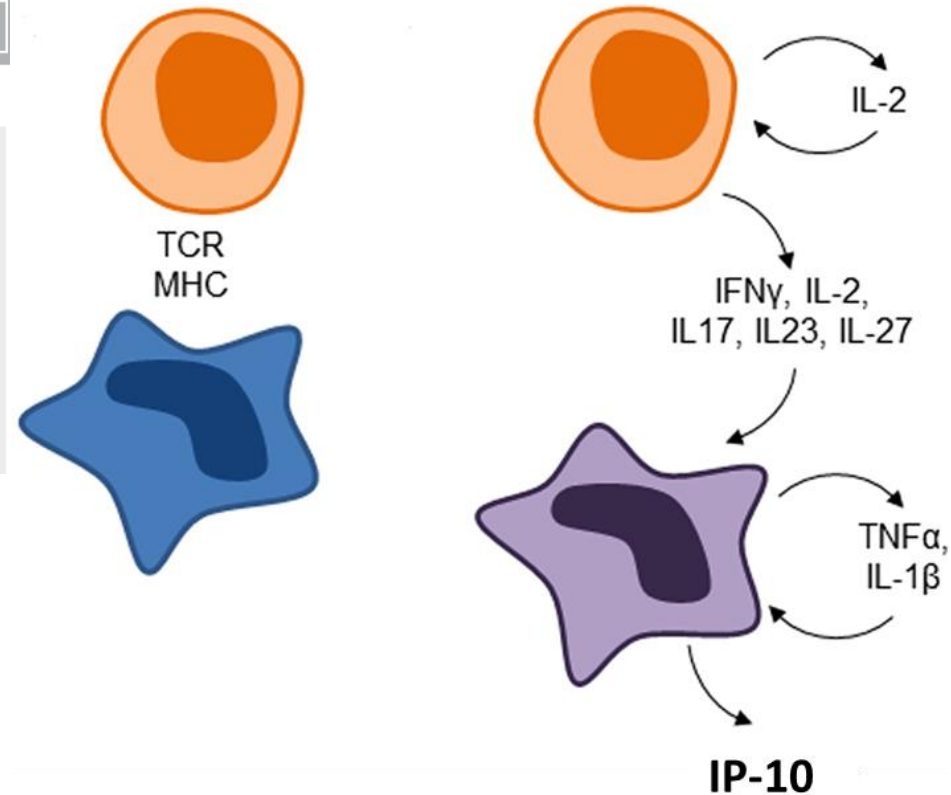
- CFP10 ve ESAT-6 kadar IFN- γ yanıtına neden olduğu ve
- MTB spesifik olduğu gösterilmiştir.
- Tanısal olarak kullanılabileceği iddia edilmiştir.

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 ölçümü test duyarlılığını artırabilir.
- Küçük çocuklarda ve CD4 sayısı düşük HIV ile infekte kişilerde T-hücre temelli TB enfeksiyonu tanısını iyileştirebilir.

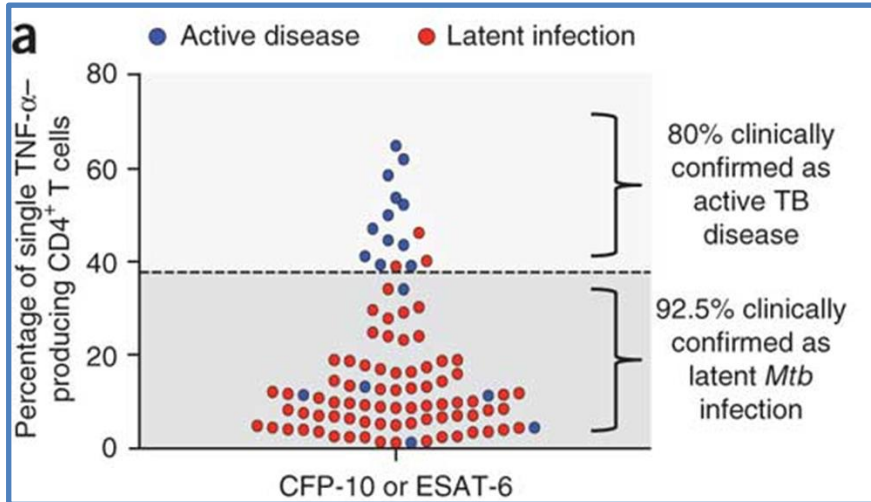
III. T hücre fenotipi belirleme

- 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

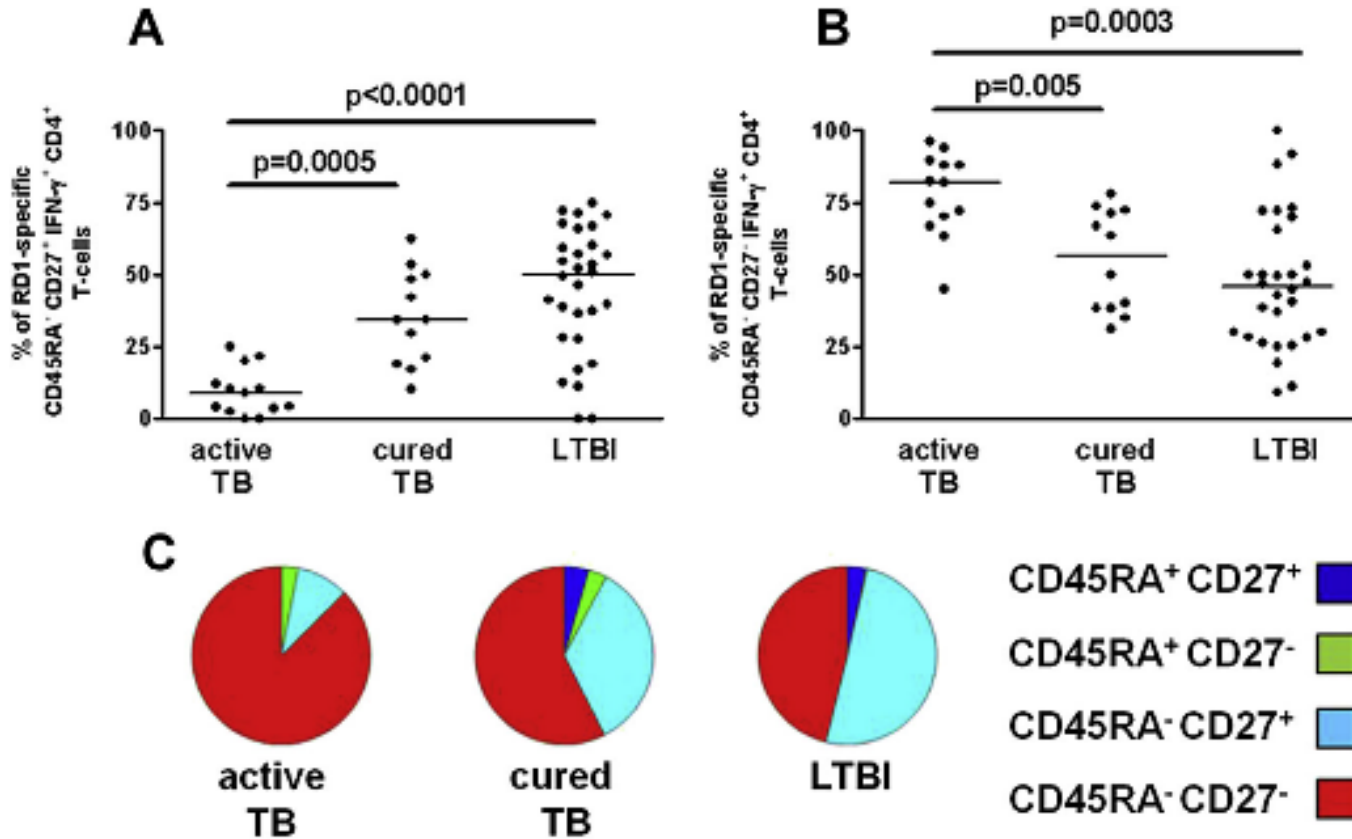
III.b. Hücre yüzey belirteçlerine göre T hücre fenotipi

- Hücre yüzey belirteçleri;
 - CD27, CD4Ra, CCR7, CD42L, IL-7 α R,
- Yöntemler;
 - Flowsitometrik analiz
- 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

LTBİ tanısında test seçimi

- LTBİ tanısı önerilen tüm durumlarda: **TDT veya İGST**
 - **İstisna:** <2 yaş → **TDT**
 - **TDT tercih edilecek durumlar:**
 - TB insidansı yüksek ülke
 - Ekonomik nedenler (gelir düzeyi düşük ülke)
 - <5 yaş
 - **İGST tercih edilecek durumlar:**
 - BCG'li
 - Okuma için tekrar gelme olasılığı düşüklerde
 - **İki basamaklı test tercih edilecek durumlar:**
 - **İlk test Pozitif, Ancak;**
 - İlk test TDT, BCG aşılama öyküsü var
 - Tedaviye uyumu artırmak için ek kanıta gereksinim var
 - Sağlıklı ve düşük bulaş ve progresyon riski
 - **İlk test Negatif, Ancak;**
 - Yüksek bulaş riski
 - Yüksek aktif hastalığa progresyon riski (ör. anti-TNF kullanıcısı)
 - Test duyarlılığını düşürecek durumlar (ör. HIV pozitif)
 - TB hastalığı klinik kuşkusunu
 - **İki kez İGST sonucu belirsiz/geçersiz**



Sonuç Olarak;



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

