

QuantiFERON TB Gold test - screeningové vyšetření latentní tuberkulózy u pacientů s IBD

ISCARE - Edukační seminář IBD pro zdravotní laboranty

6.2.2019

Mgr. Irena Francová – VFN – laboratoř klinické imunologie a alergologie

IGRA testy – Interferon- γ released assays

IGRA testy – testy založené na detekci uvolněného INF γ

QuantiFERON-TB Gold, QuantiFERON-TB Gold Plus, T-SPOT -TB

Doporučení Sekce pro tuberkulózu ČPFS (prosinec 2005) k využití IGRAs – TB:

- diferenciální diagnostika abacilární TBC
- diagnostika latentní TBC
- vyšetření rizikových skupin
- **je doporučeno sledování nemocných léčených biologickou léčbou anti-TNF α** (revmatologie, kožní, gastroenterologie, plicní..)

Latentní tuberkulóza (LTBI)

Latentní tuberkulóza (LTBI)

stav perzistující imunitní odpovědi na stimulaci antigeny *M. tuberculosis* bez známek klinicky manifestní aktivní tuberkulózy (TB)



SEKCE PRO TUBERKULÓZU:

- [Doporučení pro biologickou léčbu preparáty blokujícími účinek TNF \$\alpha\$](#)
aktualizace 2016
- [Tuberkulóza dětí a mladistvých \(Standard léčebného plánu\)](#)
aktualizace 2016
- [Tuberkulóza dospělých \(Standard léčebného plánu\)](#)
aktualizace 2016
- [Doporučený postup pro diagnostiku a léčbu netuberkulózních mykobakterií dospělých](#)
aktualizace 2016
- [Tuberkulóza a LTBI u pacientů před a po transplantaci solidních orgánů či hematopoetických kmenových buněk](#)
aktualizace 2016
- [Standard poskytování dispenzární péče nemocným tuberkulózou aj. mykobakteriemi a osobám s vyšším rizikem vzniku těchto onemocnění](#)
aktualizace 2016
- [Doporučený postup diagnostiky a léčby latentní tuberkulózní infekce](#)
aktualizace 2015

Jedna třetina světové populace je infikována *M. tuberculosis*.

většina infikovaných bez symptomů aktivní TB, není pro ostatní nakažlivá

!riziko rozvoje aktivní TB!

- celoživotní riziko rozvoje aktivní TB v terénu LTBI je 5-10%
- nejvyšší 5 let po infekci
- stupeň rizika rozvoje aktivní TB je ovlivňován řadou faktorů, nejvíce imunitním stavem jedince

Největší přínos z preventivní léčby tedy mají právě jedinci v nejvyšším riziku rozvoje aktivní TB.

Vyhledávání a léčba LTBI u rizikových skupin je jednou z hlavních metod eliminace TB v zemích s nízkou incidencí TB, mezi které ČR patří.

Rozvoji TB z LTBI lze do jisté míry předejít preventivní léčbou.

Screening LTBI – rizikové skupiny

Systematické testování LTBI **je doporučeno** u těchto skupin:

- HIV infikovaní
- Děti i dospělí v kontaktu s pacienty s TB
- **Pacienti zahajující léčbu preparáty anti- TNF alfa, případně jinými léky ovlivňujícími imunitní systém, u kterých je zvýšené riziko vzplanutí TB**
- Pacienti na dialýze
- Kandidáti transplantace krevetvorných buněk a solidních orgánů
- Pacienti se silikózou

Systematické testování **by mělo být zvaženo** u těchto skupin:

- Vězni
- Pracovníci ve zdravotnictví
- Přistěhovalci ze zemí s vysokou incidencí TB
- Bezdomovci
- Pravidelní uživatelé ilegálních drog

Pro screening LTBI doporučeny IGRA testy nebo tuberkulinový kožní test Mantoux

Anti TNF α terapie u IBD

Anti TNF α protilátky potlačují tvorbu granulomů a ohraničení u infekce *M. tuberculosis*



reaktivace infekce

Při reaktivaci – častěji pozorovány formy extrapulmonární a diseminované

Před zahájením biologické léčby - screening LTBI

- RTG snímek plic ve dvou projekcích
- IGRA nebo Mantoux II kožní test

Doporučeno i před podáváním antiintegrinové terapie - Vedolizumab

doi: 10.14735/amgh201611

Doporučení pro podávání biologické terapie u idiopatických střevních zánětů: třetí, aktualizované vydání

Guidelines for the administration of biological therapy in patients with inflammatory bowel diseases: third, updated edition

M. Bortlík^{1,2}, D. Ďuricová, P. Kohout, M. Konečný, J. Koželuhová, A. Novotný, V. Zbořil, L. Prokopová, T. Douda, J. Stehlík, O. Shonová, K. Mareš, L. Hrdlička, P. Matějková, Z. Šerclová, L. Nedbalová, M. Tomanová, M. Liberda, J. Bronský, K. Mitrová, P. Drastich, O. Ryska, P. Falt, J. Březina, T. Vaňásek, J. Kalvach, M. Kolář a M. Lukáš

¹Klinické a výzkumné centrum pro střevní záněty ISCARE I.V.F. a.s., Praha
²Interní klinika I. LFUK a ÚVN Praha

Článek lze stáhnout zde: 

Informace o stahování QR kódů naleznete na: www.qr-kody.cz/qr-ctecka

IGRA *versus* tuberkulinový kožní test

IGRA

- Vyšší specifita testů – 98 %
- Vyšší senzitivita testů – 95 %
- Použité antigeny – zajišťují, že test není ovlivněn předchozí vakcinací BCG
- Rychlejší doba odezvy
- Menší zátěž pro pacienta

- Správný odběr vzorku
- Preanalytika
- Cena, ale cost effectivity
- Děti starší než 5 let
- Imunodeficientní osoby
- Osoby exponované v nedávné době infekci *M. tuberculosis*



Mantoux = tuberkulinový kožní test

- Senzitivita – 70 %
- Specifita – 59 % pro populaci očkovanou BCG
- Subjektivní chyba při odečtu testu
- Falešná pozitivita testu po předchozí vakcinaci BCG
- Další testování i dodatečné náklady spojené s ATB profylaxí
- Vyšší riziko nežádoucích reakcí
- Dostupnost – kalmetizační stanice
- Nutné 2 návštěvy pacienta

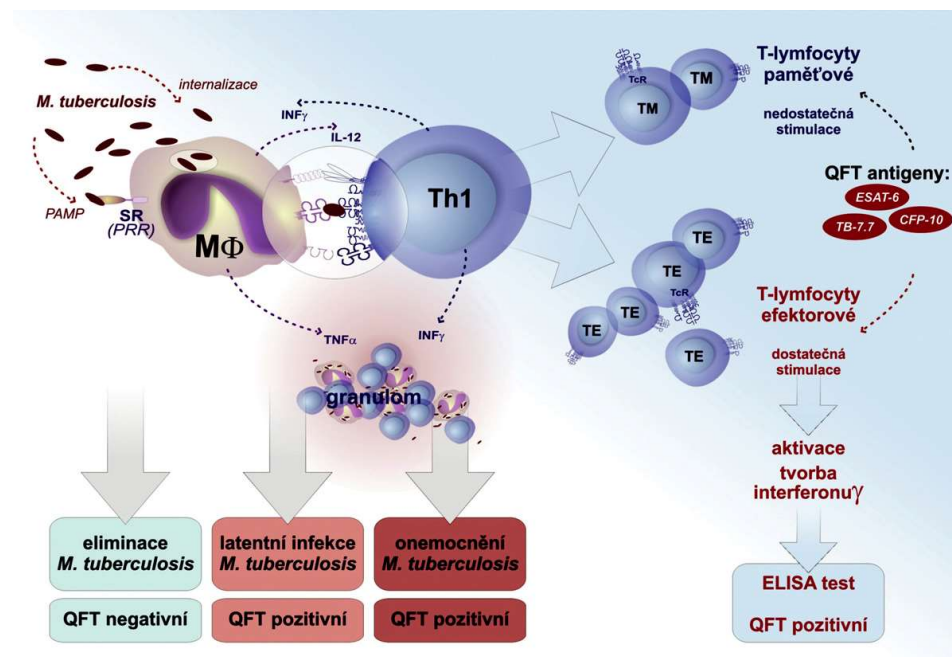
- Děti do 5 let věku
- Cena
- Technická náročnost



Princip testu – QUANTIFERON TB GOLD (PLUS)

Detekce INF- γ produkovaného paměťovými T-ly, které byly v minulosti exponovány antigenům *M. tuberculosis*

- Specifické antigeny stimulují odpověď pouze u jedinců infikovaných *M. tuberculosis*, dále pak *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum*, nejsou obsaženy v BCG vakcinačním kmeni *M. bovis*.
- rozpoznání cirkulujícím paměťovými efektorovými i Th lymfocyty v periferní krvi – sekrece cytokinů INF- γ
- stanovení koncentrace INF- γ metodou ELISA
- zároveň prováděné kontroly zařazené pro každého pacienta (nulová a mitogenní) zajišťují validitu výsledku

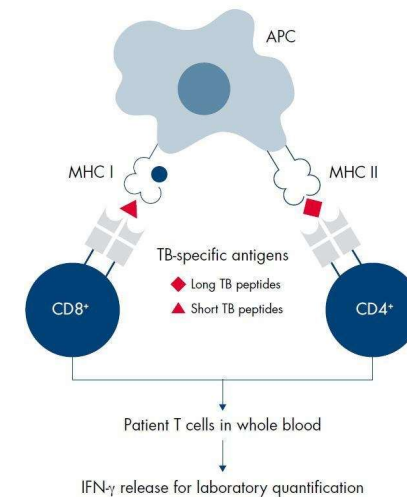
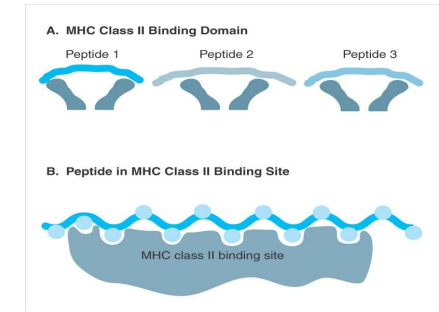
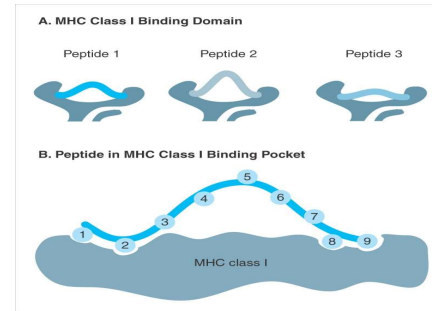


QTF-TB PLUS – stimulace tvorby INF- γ

Antigeny = proteiny **ESAT-6** a **CFP-10**

Směs antigenů ve zkumavce TB1 – delší
peptidy (cca 20 AMK) – rozpoznání MHC II
a stimulace CD4+ buněk

Směs antigenů ve zkumavce TB2 – navíc
kratší peptidy (cca 10 AMK) – rozpoznání
MHC I a stimulace CD8+ buněk





Způsob provedení testu -kroky

1. Odběr
2. Inkubace vzorku, úprava a jeho uskladnění
3. Provedení samotného ELISA testu
4. Vyhodnocení testu



Odběr vzorku krve

Inovace testu PLUS – 4- zkumavkový, navíc zkumavky s antigeny pro stimulaci CD4+ i CD8+ buněk

Vakuový systém odběru

Možno i nakapat z kanyly, případně odebrat do Li-heparinu a rozlít do zkumavek

! Dodržet požadovaný objem vzorku !

Test validován pro rozmezí 80 – 120 % požadovaného množství – po rysku

Při nadbytku vzorku – nedostatečná odpověď v mitogenní i TB zkumavce – test nelze hodnotit, nutno opakovat

Po odběru zkumavky promíchat – min 10x, poté uchovávat ve vzpřímené poloze

Načasování odběru – nutno počítat s inkubací přes noc





Inkubace vzorku, úprava a jeho uskladnění

Transport – max 16 hod při teplotě při laboratorní teplotě ve vzpřímené poloze

! Ne potrubní poštou !

Inkubace – 16 – 24 hod při 37°C ve vzpřímené poloze

Centrifugace a oddělení plasmy – 2000-3000 RCF/ 15 minut

Oddělení plasmy – neslívát, nenabrat gelovou zátku

Skladování plasmy – 28 dní v lednici, pro delší skladování nutné zamrazit na -20°C

! Záměna vzorku !

Provedení testu - ELISA



Ředění standardů

Lyofilizovaný konjugát

Promíchání mražených vzorků

Schéma pipetování

Promíchat v pipetovací destičce na začátku 1.
a 2. inkubace

Dobré promytí mezi 1. a 2. inkubací kroky
6x400 μ l

Vyhodnocení testu

QTF-PLUS Analysis Software

Vyhodnocení koncentrace INF- γ na základě kalibrační křivky v IU/ml

Hodnocení validity testu

- OD standardů,
- CV replikátů,
- Korelační koeficient kalibrační křivky

Interpretace výsledků na základě rozdílů odpovědi na TB antigeny a na mitogen oproti NIL kontrole

NIL [IU/ml]	TB1 minus NIL [IU/ml]	TB2 minus NIL [IU/ml]	Mitogen minus NIL [IU/ml] ¹	QFT Výsledek	Interpretace
≤ 8,0	<0,35 nebo ≥0,35 a <25 % hodnoty nulové kontroly (NIL)	<0,35 nebo ≥0,35 a <25 % hodnoty nulové kontroly (NIL)	≥ 0,5	Negativní	Infekce M. tuberculosis NENÍ pravděpodobná
	≥ 0,35 a ≥ 25 % hodnoty nulové kontroly	Jakýkoli výsledek	Jakýkoli výsledek	Pozitivní	Infekce M. tuberculosis JE pravděpodobná
	Jakýkoli výsledek	≥ 0,35 a ≥ 25 % hodnoty nulové kontroly			
	<0,35 nebo ≥0,35 a <25 % hodnoty nulové kontroly	<0,35 nebo ≥0,35 a <25 % hodnoty nulové kontroly	< 0,5	Nelze hodnotit	Pravděpodobnost Infekce M. tuberculosis Nelze určit
> 8,0	Jakýkoli výsledek				



QuantiFERON®-TB Gold In-Tube Results

Version 2.62

Run Date: středa 23 leden 2019
Operator: sarka
Run Number: 1
Kit Batch Number: 56008993

Valid ELISA test run.

Std	Conc	Mean	% CV	QC Result
S1	4.00	1.649	3.6	PASS
S2	1.00	0.474	5.6	PASS
S3	0.25	0.129	N/A	PASS
S4	0.00	0.004	N/A	PASS

Intercept: -0.7642 Slope: 0.9180 Correlation Coefficient: 1.00 (PASS)

Raw Data (OD)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.016	0.007	3.700	1.716	1.621	1.609	0.261	0.249	3.700	0.012	0.013	3.347
B	0.007	0.006	3.700	0.500	0.474	0.447	0.158	0.152	3.700	0.028	0.026	0.851
C	0.019	0.012	3.700	0.136	0.128	0.123	0.045	0.049	3.700	0.018	0.030	1.793
D	0.063	0.042	3.700	0.086	0.083	0.083	0.031	0.061	1.303	0.046	0.016	3.700
E	0.005	0.013	3.700	0.077	0.158	3.700	0.178	0.707	3.700	0.021	0.017	3.009
F	0.026	0.015	3.700	0.029	0.021	3.700	0.046	1.591	3.700	0.020	0.024	0.485
G	0.005	0.029	3.700	0.040	0.085	3.700	0.055	0.072	3.700	0.008	0.010	3.244
H	0.268	0.114	3.700	0.053	0.050	3.700	0.019	0.023	0.153	0.011	0.012	3.232



QuantiFERON®-TB Gold In-Tube Results

Version 2.62

Run Date: pátek 4 leden 2019
Operator: sarka
Run Number: 1
Kit Batch Number: 56008993

Valid ELISA test run.

Results (IU/mL)						
Subject ID	Nd	TB Ag	Mitogen	TB Ag - Nd	Mitogen - Nd	Result
32050	0.04	0.02	8.59	-0.02	8.53	NEGATIVE
32055	0.01	0.02	> 10	0.01	> 10	NEGATIVE
32056	0.05	0.02	1.63	-0.03	1.58	NEGATIVE
32118	0.01	0.01	> 10	0.00	> 10	NEGATIVE
32129	0.01	0.01	> 10	0.00	> 10	NEGATIVE
32130	0.04	0.03	> 10	-0.01	> 10	NEGATIVE
32140	0.01	0.00	9.99	-0.01	9.97	NEGATIVE
32156	0.02	0.01	> 10	-0.01	> 10	NEGATIVE
32181	0.00	0.01	> 10	0.01	> 10	NEGATIVE
32192	0.04	0.05	> 10	0.01	> 10	NEGATIVE
32271	0.01	0.02	> 10	0.01	> 10	NEGATIVE
32272	0.01	0.03	0.46	0.02	0.45	INDETERMINATE
	0.02	0.01	6.51	-0.01	6.49	NEGATIVE
32370	0.03	0.03	> 10	0.00	> 10	NEGATIVE
32371	0.02	0.02	> 10	0.00	> 10	NEGATIVE
32375	0.01	0.00	> 10	-0.01	> 10	NEGATIVE
32389	0.01	0.01	1.66	0.00	1.65	NEGATIVE
32396	0.01	0.03	> 10	0.02	> 10	NEGATIVE
3	0.03	0.01	> 10	-0.02	> 10	NEGATIVE
41	0.01	0.02	> 10	0.01	> 10	NEGATIVE
58	0.02	0.02	> 10	0.00	> 10	NEGATIVE
103	0.04	1.91	> 10	1.87	> 10	POSITIVE
119	0.02	0.02	> 10	0.00	> 10	NEGATIVE
116	0.01	0.01	> 10	0.00	> 10	NEGATIVE
124	3.01	3.88	> 10	0.87	9.73	POSITIVE
138	0.01	0.01	> 10	0.00	> 10	NEGATIVE
139	0.01	0.00	4.97	-0.01	4.96	NEGATIVE
158	0.03	0.00	4.00	-0.03	3.97	NEGATIVE

Hodnocení testu QTF-TB GOLD

	Nil	TB	M	TB - NIL	M - NIL	Result
ID 14-1327	0,31	0,30	9,30	-0,01	9,20	NEGATIVE
ID 15-1328	0,08	0,09	9,56	0,01	9,48	NEGATIVE
ID 16-1613	0,05	0,11	3,58	0,06	3,53	NEGATIVE
ID 17-1623	0,35	1,58	9,56	1,23	9,21	POSITIVE
ID 18-1624	0,08	3,81	9,56	3,73	9,48	POSITIVE
ID 19-1669	0,10	0,13	9,56	0,03	9,46	NEGATIVE
ID 20-1747	0,03	0,04	0,26	0,01	0,23	INDETERMINATE
ID 21-1890	0,02	0,02	8,57	0,00	8,55	NEGATIVE
ID 22-1904	0,05	0,04	1,00	0,01	1,03	NEGATIVE

Hodnocení testu QTF TB GOLD Plus



QuantIFERON® -TB Gold Plus Results

Run Date: pondělí 28 leden 2019

Operator: m

Run Number: x

Kit Batch Number: 111

Version 2.71

Valid ELISA test run.

Results (IU/mL)								
Subject ID	Nil	TB1	TB2	Mitogen	TB1- Nil	TB2- Nil	Mitogen- Nil	Result
ID 1	0.10	0.06	0.07	5.25	-0.04	-0.03	5.15	NEGATIVE
ID 2	0.09	1.80	1.99	4.94	1.71	1.90	4.85	POSITIVE
ID 3	0.05	0.15	2.51	4.60	0.10	2.46	4.55	POSITIVE
ID 4	5.16	4.05	3.82	3.71	-1.11	-1.34	-1.45	INDETERMINATE
ID 5	0.06	0.04	0.03	0.07	-0.02	-0.03	0.01	INDETERMINATE
ID 6	0.09	0.07	0.04	3.82	-0.02	-0.05	3.73	NEGATIVE
ID 7	N/S	N/S	N/S	N/S	-	-	-	DATA MISSING
ID 8	N/S	N/S	N/S	N/S	-	-	-	DATA MISSING
ID 9	N/S	N/S	N/S	N/S	-	-	-	DATA MISSING
ID 10	N/S	N/S	N/S	N/S	-	-	-	DATA MISSING
ID 11	N/S	N/S	N/S	N/S	-	-	-	DATA MISSING
ID 12	N/S	N/S	N/S	N/S	-	-	-	DATA MISSING

Valid ELISA test run.

Results (IU/mL)								
Subject ID	Nil	TB1	TB2	Mitogen	TB1- Nil	TB2- Nil	Mitogen- Nil	Result
ID 1	0.10	0.06	0.07	5.25	-0.04	-0.03	5.15	NEGATIVE
ID 2	0.09	1.80	1.99	4.94	1.71	1.90	4.85	POSITIVE
ID 3	0.05	0.15	2.51	4.60	0.10	2.46	4.55	POSITIVE
ID 4	5.16	4.05	3.82	3.71	-1.11	-1.34	-1.45	INDETERMINATE
ID 5	0.06	0.04	0.03	0.07	-0.02	-0.03	0.01	INDETERMINATE
ID 6	0.09	0.07	0.04	3.82	-0.02	-0.05	3.73	NEGATIVE

? Malý kvíz na závěr ?

Pacient nevyvine odpověď v mitogenní zkumavce, jaké budou možné interpretace výsledku?

Pacient vykazuje vysokou odpověď (> 8 IU/ml) v NIL zkumavce, jaké budou možné interpretace výsledku?

Jak bude vypadat odpověď pacienta HIV pozitivního?

Pacient byl očkován BCG vakcínou, bude QTF test validní?

Jakou můžeme očekávat odpověď v QTF testu u pacientů infikovaných netuberkulózními mykobakteriálními kmeny?