

# Νεώτερες εργαστηριακές τεχνικές στη διάγνωση και στον έλεγχο της φυματίωσης

Δ. Ιακωβίδης  
Πνευμονολόγος  
Αν. Διευθυντής  
Μονάδα επεμβατικής Πνευμονολογίας  
Γ.Π.Ν. «Γ. Παπανικολάου»

## Νέα διαγνωστικά μέσα για τη λανθάνουσα φυματίωση

- Η στοχευμένη δοκιμασία δερματικής φυματινοαντίδρασης (TST) για την ανεύρεση της LTBI, αποτελεί σημαντικό συστατικό της στρατηγικής ελέγχου της TB. Η θεραπεία ατόμων με LTBI μειώνει δραστικά τον κίνδυνο ανάπτυξης ενεργού TB.
- Η παρουσία ανοσοκαταστολής ή παραγόντων κινδύνου μετατροπής της LTBI σε ενεργό TB συχνά συνοδεύεται από ψευδώς αρνητική TST. Λόγω μειωμένης ευαισθησίας της TST στερούνται τα άτομα την έγκαιρη προληπτική θεραπεία.

## Νέα διαγνωστικά μέσα για τη λανθάνουσα φυματίωση

- Η TST περιέχει 200 αντιγόνα που σε μεγάλο βαθμό είναι κοινά για Mtb complex, στελέχη BCG και MOTT.
- Έτσι η ψευδώς θετική TST (μειωμένη ειδικότητα) οδηγεί σε αντί-TB αγωγή άτομα μη μολυσμένα.
- Η TST χρησιμεύει στην ανίχνευση της TB για ένα αιώνα και πλέον, έχει όμως τα προβλήματά της.
  - Δυσκολία στην ακρίβεια μέτρησης και ερμηνείας.
  - Χαμηλή ευαισθησία σε άτομα με καταστολή της CMI και σε πρώιμη λοίμωξη
  - Χαμηλή ειδικότητα σε άτομα με BCG και λοίμωξη από άτυπα.
  - Φαινόμενο Boosting.

## Νέα διαγνωστικά μέσα για τη λανθάνουσα φυματίωση

### Δοκιμασία έκκρισης IFN- $\gamma$ (IGRAs)

#### Αρχή της δοκιμασίας

Αποτελεί *in vitro* δοκιμασία κυτταρικής ανοσιακής απάντησης (CMI) που βασίζεται στην απελευθέρωση IFN- $\gamma$  από τα ευαισθητοποιημένα T-λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Τα ειδικά αντιγόνα που χρησιμοποιούνται για τη διέγερση των T-λεμφοκυττάρων είναι:

ESAT-6 ( Early Secreted Antigen Target-6)

CPF-10 (Culture Filtrate Protein-10)

Τα αντιγόνα κωδικοποιούνται στην περιοχή του γονιδιώματος RD1 που υπάρχει στο *Mtub complex*, λείπει όμως από *M.Bovis BCG* και OTT με εξαίρεση *M. Marinum*, *Kansasii*, *Szulgai*.

## Νέα διαγνωστικά μέσα για τη λανθάνουσα φυματίωση

### Δοκιμασία έκκρισης IFN- $\gamma$ (IGRAs)

Ανάπτυξη και προώθηση στο εμπόριο δύο νέων ανοσολογικών δοκιμασιών για την LTBI.

**Quantiferon –TB Cold**  
(Celestis Australia)

**Τεχνική ELISA**

Μέτρηση IFN- $\gamma$  στο αίμα.

Έχει έγκριση FDA

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

**Τεχνική Elispot**

Μέτρηση T-λεμφοκυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$ .

## Νέα διαγνωστικά μέσα για τη λανθάνουσα φυματίωση

### Δοκιμασία έκκρισης IFN- $\gamma$ (IGRAs)

**Σε σύγκριση με το TST οι IGRAs .**

Πλεονεκτήματα:

- Απαιτεί μόνο μία επίσκεψη στον ασθενή.
- Τα αποτελέσματα μπορεί να είναι διαθέσιμα σε 24 ώρες.
- Δεν προκαλεί το φαινόμενο Booster .
- Δεν τίθεται ζήτημα κακής εκτίμησης του αποτελέσματος.
- Δεν επηρεάζεται από την προσβολή με άτυπα μυκοβακτηρίδια.
- Δεν επηρεάζεται από BCG – εμβολιασμό.

Περιορισμοί:

- Ανάγκη για λήψη αίματος.
- Ταχεία επεξεργασία σε ειδικό εργαστήριο.
- Λάθη στη συλλογή και τη μεταφορά, μειώνουν την ακρίβεια.

## Νέα διαγνωστικά μέσα για τη λανθάνουσα φυματίωση

### Κατευθυντήριες γραμμές για τις δοκιμασίες απελευθέρωσης IFN- $\gamma$ (IGRAs)

Σε χώρες με οδηγίες και κατευθυντήριες γραμμές για την χρήση των IGRAs υπάρχουν οι παρακάτω διακριτές προσεγγίσεις:

- Το TST θα πρέπει να αντικατασταθεί από τις IGRAs.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθούν είτε η TST είτε οι IGRAs.
- Προσέγγιση αρχικά με TST και στη συνέχεια οι IGRAs, για την βελτίωση της ευαισθησίας και της ειδικότητας της TST.

## Νέα διαγνωστικά μέσα για τη λανθάνουσα φυματίωση

### Κατευθυντήριες γραμμές για τις δοκιμασίες απελευθέρωσης IFN- $\gamma$ (IGRAs)

Η χρήση των IGRAs ποικίλει ανά περιοχή

**Η.Π.Α.:** Προτείνεται η χρήση της QTF-G σε όλες τις περιπτώσεις που υπάρχει υποψία ή κίνδυνος για υποκλινική TB.

**ΕΥΡΩΠΗ:** Προτείνεται η χρήση των IGRAs στις περιπτώσεις:

- i. Θετικής TST
- ii. Αναξιόπιστης TST
- iii. Σε ανοσοκαταστολή

## Νέα διαγνωστικά μέσα για τη λανθάνουσα φυματίωση

# Κατευθυντήριες γραμμές για τις δοκιμασίες απελευθέρωσης IFN- $\gamma$ (IGRAs)

Οδηγίες από το **National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE)**  
2006 UK

- Χρήση IGRAs σαν δοκιμασία πρώτης γραμμής όταν η TST είναι λιγότερο αξιόπιστη π.χ. σε ασθενείς με ανοσοκαταστολή.
- Χρήση IGRAs σε δεύτερη γραμμή για επιβεβαίωση θετικής TST σε όλες τις περιπτώσεις.
- Συμβολή των IGRAs στην διάγνωση ενεργού TB ειδικά μη πνευμονικής σαν δοκιμασία αποκλεισμού.

## Νέα διαγνωστικά μέσα για τη λανθάνουσα φυματίωση

# Κατευθυντήριες γραμμές για τις δοκιμασίες απελευθέρωσης IFN- $\gamma$ (IGRAs)

Health Protection Agency 2007 UK

Εκσυγχρονίζει τις οδηγίες της NICE

### **Ενεργός νόσος:**

Οι IGRAs χρησιμοποιούνται για επιβεβαίωση της ενεργού νόσου όταν δεν είναι δυνατή η επιβεβαίωση με καλλιέργεια και δεν υπάρχουν σαφείς ακτινολογικές και ιστοπαθολογικές αποδείξεις.

### **Υποκλινική νόσος:**

- Οι IGRAs χρησιμοποιούνται για μεγαλύτερη ειδικότητα στον πληθυσμό με εμβολιασμό BCG.
- Ακολουθούν την TST όταν είναι θετική.
- Οι IGRAs δυνατόν να είναι η μόνη δοκιμασία σε ανοσοκαταστολή, σε screening μεγάλου πληθυσμού με αδυναμία δεύτερης επίσκεψης, εργαζομένων σε υπηρεσίες υγείας και πριν από αντι-TNF αγωγή

## Νεώτερες εργαστηριακές τεχνικές στη διάγνωση και στον έλεγχο της φυματίωσης

**Η ενεργός TB διαγιγνώσκεται με συμβατικές εργαστηριακές μεθόδους που περιλαμβάνουν.**

- Εμπλουτισμό του δείγματος και μικροσκοπική εξέταση για την παρουσία οξεάντοχων βακτηριδίων.
- Καλλιέργεια σε στερεά ή υγρά θρεπτικά υλικά.
- Ταυτοποίηση του στελέχους.
- Έλεγχος της ευαισθησίας στα αντιφυματικά.

## Νεώτερες εργαστηριακές τεχνικές στη διάγνωση και στον έλεγχο της φυματίωσης

**Η μικροσκοπική εξέταση είναι η ταχύτερη μέθοδος  
ανίχνευσης αλλά παρουσιάζει:**

- Χαμηλή ευαισθησία 50-80%. Απαιτούνται  $10^3$ - $10^4$  bac/ml.
- Αδύνατος ο διαχωρισμός M<sub>tub</sub> από ΜΟΤΤ.
- Πρόσφατα μία νέα μέθοδος η USP απαιτεί 300 bac/ml.

## Νεώτερες εργαστηριακές τεχνικές στη διάγνωση και στον έλεγχο της φυματίωσης

**Η καλλιέργεια είναι απαραίτητη για τους εξής λόγους:**

- Μεγάλη ευαισθησία στην ανίχνευση. Απαιτεί  $10-10^2$  bac/ml.
- Η ευαισθησία της καλλιέργειας 80-85%, η ειδικότητα 98%.
- Η ανάπτυξη του παθογόνου απαραίτητη για την ταυτοποίηση.
- Η δοκιμασία ευαισθησίας στα αντιφυματικά απαιτεί την καλλιέργεια του παθογόνου.
- Ο γονοτυπικός έλεγχος του παθογόνου είναι χρήσιμος για επιδημιολογικές μελέτες.

## Νεώτερες εργαστηριακές τεχνικές στη διάγνωση και στον έλεγχο της φυματίωσης

**Γιατί οι νεώτερες (μοριακές) μέθοδοι  
είναι αναγκαίες στη διάγνωση;**

- Η αντιμετώπιση των ενεργών περιπτώσεων TB λόγω απουσίας αποτελεσματικού εμβολίου είναι το σημαντικότερο στοιχείο στο πρόγραμμα ελέγχου TB.
- Η άμεση μικροσκόπηση για την παρουσία οξεάντοχων βακτηριδίων είναι με ελαττωμένη αξία λόγω χαμηλής ευαισθησία και ειδικότητας.
- Η απουσία μεθόδου ταχείας και ακριβούς διάγνωσης οδηγεί σε εμπειρική θεραπεία πιθανώς μη απαραίτητης ή μη αποτελεσματικής.

## Νεώτερες εργαστηριακές τεχνικές στη διάγνωση και στον έλεγχο της φυματίωσης

**Γιατί οι νεώτερες (μοριακές) μέθοδοι είναι αναγκαίες στη διάγνωση;**

- Ασθενείς με αρνητική μικροσκοπική εξέταση με καθυστέρηση στη διάγνωση και στη θεραπευτική αγωγή επιδεινώνονται και ευθύνονται για τη διάδοση της φυματίωσης.
- Η κλινική εικόνα και τα ακτινολογικά ευρήματα θέτουν υπόνοια φυματίωσης στο 50% των περιπτώσεων. Με τα κλινικά ευρήματα δεν τίθεται πάντοτε διάγνωση. Μπορούμε όμως να ορίσουμε τους ασθενείς στους οποίους δικαιολογούνται ειδικές εξετάσεις.

## Νεώτερες εργαστηριακές τεχνικές στη διάγνωση και στον έλεγχο της φυματίωσης

### **Μοριακές τεχνικές – Ταχεία διάγνωση**

- Βασική αρχή κάθε μοριακής τεχνικής είναι η ανίχνευση τμήματος αλληλουχίας DNA του μυκοβακτηριακού γονιδιώματος που επιλέγουμε σαν στόχο.
- Ο πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας – στόχου είναι απαραίτητος για την ανίχνευση.
- Επιτυγχάνεται με ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές – primers) και ειδική πολυμεράση( μέθοδος PCR).

## Νεώτερες εργαστηριακές τεχνικές στη διάγνωση και στον έλεγχο της φυματίωσης

### Προβλήματα – Αδυναμίες

- Επιμόλυνση στη διαδικασία εφαρμογής NAA από προϋπάρχοντα προϊόντα πολλαπλασιασμού. Απαιτείται αυστηρή προδιαγραφή χώρου, εμπειρία προσωπικού και ειδικά αυτόματα μηχανήματα.
- Αδυναμία διάκρισης ζώντων και νεκρών παθογόνων. Ανίχνευση του παθογόνου δε σημαίνει πάντα νόσος (αποικισμός - παλαιά νόσος).
- Αδυναμία του πολλαπλασιασμού από αναστολείς.
- Αδυναμία εκτέλεσης test ευαισθησίας λόγω απομόνωσης επιλεγμένης αλληλουχίας DNA και όχι ολόκληρου του M<sub>tub</sub>.

## Νεώτερες εργαστηριακές τεχνικές στη διάγνωση και στον έλεγχο της φυματίωσης

### Διαθέσιμες δοκιμασίες ανίχνευσης

- Amplicor Mtub Test (**Amplicor MTB test**) Roche. Βασίζεται στην τεχνική PCR, ανιχνεύει DNA έχει έγκριση από FDA για δείγματα αναπνευστικού με AFB θετικά.
- Amplified M.tuberculosis Direct test (**AMTD2**) της Gene Probe. Βασίζεται σε στόχευση rRNA, μεταγραφή του RNA με βοήθεια RNA πολυμεράσης σε cDNA. Έχει έγκριση για δείγματα AFB θετικά και αρνητικά.

## Νεώτερες εργαστηριακές τεχνικές στη διάγνωση και στον έλεγχο της φυματίωσης

### **Κατευθυντήριες γραμμές CDC για τη χρήση και την ερμηνεία των δοκιμασιών NAA**

- Η δοκιμασία NAA πρέπει να γίνεται σε ένα αναπνευστικό δείγμα σε κάθε ασθενή με σημεία και συμπτώματα πνευμονικής φυματίωσης όπου η διάγνωση είναι υπό σκέψη αλλά δεν έχει επιβεβαιωθεί και το αποτέλεσμα θα μπορούσε να μεταβάλλει την αντιμετώπιση του ασθενούς.
- Η συλλογή δειγμάτων π.χ. πτύελα για καλλιέργεια και χρώση Mtub. δεν πρέπει να καθυστερεί λόγω NAA test.
- Κάθε ασθενής που εξετάζεται για NAA test θα πρέπει ταυτόχρονα να εξετάζεται για μικροσκόπηση και καλλιέργεια Mtub.

## Νεώτερες εργαστηριακές τεχνικές στη διάγνωση και στον έλεγχο της φυματίωσης

**Κατευθυντήριες γραμμές CDC για τη χρήση  
και την ερμηνεία των δοκιμασιών NAA.**

- Τα αποτελέσματα NAA δοκιμασιών πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της μικροσκοπικής εξέτασης για οξεάντοχα AFB.
- Η καλλιέργεια M<sub>tub</sub> είναι η εξέταση Gold Standard για την επιβεβαίωση της διάγνωσης.
- Με βάση τα αποτελέσματα NAA δεν ξεκινά θεραπεία και δεν διακόπτεται θεραπεία για TB.

## Νεώτερες εργαστηριακές τεχνικές στη διάγνωση και στον έλεγχο της φυματίωσης

### **Κατευθυντήριες γραμμές CDC για τη χρήση και την ερμηνεία των δοκιμασιών NAA.**

- Εάν NAA θετική και χρώση AFB θετική, θεωρείται TB, έναρξη θεραπείας και αναμονή καλλιέργειας.
- Εάν NAA θετική και χρώση AFB αρνητική, έναρξη κατά την κρίση του ιατρού και απόφαση για άλλες δοκιμασίες. Ασθενής θεωρείται ότι έχει TB εν αναμονή των αποτελεσμάτων εάν έχει δύο NAA θετικές.

## Νεώτερες εργαστηριακές τεχνικές στη διάγνωση και στον έλεγχο της φυματίωσης

**Κατευθυντήριες γραμμές CDC για τη χρήση και την ερμηνεία των δοκιμασιών NAA.**

- Εάν NAA αρνητική και AFB θετική τότε δοκιμασία για αναστολείς. Εάν δοκιμασία για αναστολείς θετική τότε κλινικό κριτήριο για έναρξη ή όχι θεραπείας, αναμένοντας καλλιέργεια για TB. Εάν δοκιμασία για αναστολείς αρνητική τότε κλινικό κριτήριο για έναρξη θεραπείας αναμένοντας καλλιέργεια για TB. Και στις δύο περιπτώσεις αποφασίζω για επιπρόσθετες θεραπείες. **Εάν δεύτερο υλικό για χρώση AFB είναι θετικό και NAA αρνητική χωρίς αναστολείς τότε πρόκειται για άτυπη μυκοβακτηριαιμία.**

## Νεώτερες εργαστηριακές τεχνικές στη διάγνωση και στον έλεγχο της φυματίωσης

### **Κατευθυντήριες γραμμές CDC για τη χρήση και την ερμηνεία των δοκιμασιών NAA.**

- Εάν NAA αρνητική και χρώση AFB αρνητική  
χρησιμοποιώ κλινικό κριτήριο για έναρξη αντι-TB αγωγής,  
περιμένοντας καλλιέργεια και επιπρόσθετες εξετάσεις.  
Οι διαθέσιμες δοκιμασίες NAA δεν έχουν ικανή  
ευαισθησία για να εξαιρέσουν τη διάγνωση TB σε  
ασθενείς με αρνητική χρώση AFB.