

# Diagnostyka gruźlicy



EURORealTime MTB



ELISPOT T-SPOT.TB

## Bezpośrednia diagnostyka gruźlicy metodą real-time PCR

- Bardzo czuła detekcja wszystkich gatunków prątków z grupy ***Mycobacterium tuberculosis complex (MTBC)*** z płwociny, popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) i wydzieliny oskrzelowej
- Obejmuje wiele wariantów genetycznych MTBC dzięki wykrywaniu **3 genów**
- Możliwość uruchomienia na **popularnych termocyklarach**
- Automatyczna ocena i dokumentacja za pomocą programu **EURORealTime Analysis**
- Szybkie uzyskanie wyniku: czas reakcji PCR – ok. **80 min**
- Stosunkowo **niski koszt**

## Diagnostyka latentnej (LTBI) postaci gruźlicy metodą ELISPOT

- Test typu IGRA (ang. *interferon gamma release assay*) pozwalający na wizualizację limfocytów T produkujących **interferon gamma (IFN- $\gamma$ )**
- Niezwykle czuła metoda, od lat wykorzystywana w diagnostyce utajonego zakażenia prątkami gruźlicy
- **Stanowi alternatywę dla próby tuberkulinowej**
- Przeznaczona do **oceny komórkowej odpowiedzi immunologicznej**
- **Wystandardyzowana** pod względem liczby komórek i warunków hodowli
- **Najlepsza** do diagnostyki LTBI u pacjentów z **obniżoną odpornością**

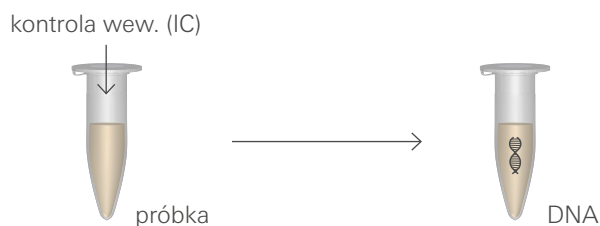


# Procedura wykonania badania metodą RT-PCR

**EURORealTime MTB** (nr kat. MP 2145-####)

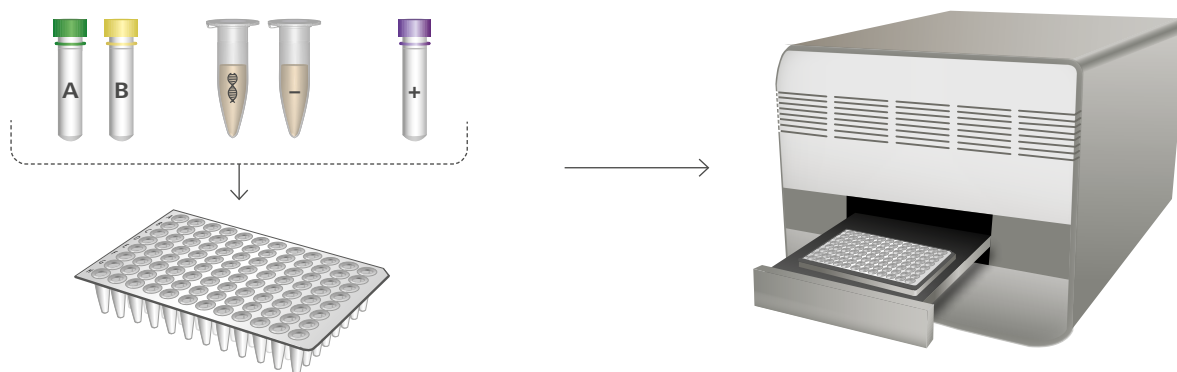
## 1. Izolacja DNA

materiał: **plwocina, popłuczyny oskrzelowe (BAL) i wydzielina oskrzelowa**



## 2. Real-time PCR

reagenty gotowe do użycia: **PCR mix A i B, kontrole** | czas reakcji: **ok. 80 min**



## 3. Analiza i raport



Pełna automatyzacja  
dzięki programowi  
**EURORealTime Analysis**

### Kompatybilny z urządzeniami:

LightCycler 480 (Roche), 7500 (Fast) Real-Time  
PCR Instrument (Applied Biosystems),  
CFX 96 Touch (Bio-Rad)



# EURORealTime MTB – czułość i swoistość



Wykrywa wszystkie gatunki prątków z grupy *Mycobacterium tuberculosis complex*:

- *M. tuberculosis*
- *M. bovis*
- *M. caprae*
- *M. microti*
- *M. africanum*
- *M. bovis BCG*
- *M. canetti*
- *M. pinnipedii*



Wysoka czułość i swoistość:

- **czułość:** 95,8%; limit detekcji (**LOD**; limit of detection) = 0,5 cp/μl DNA szczepu referencyjnego
- **swoistość:** 100%

## Porównanie metod

Czułość i swoistość EURORealTime MTB została określona w oparciu o porównanie z innym testem PCR (CE). Badanie 24 popłuczyn oskrzelowych, 62 wydzielin oskrzelowych i 36 próbek płwociny dało zgodność 95,8% dla pozytywnych próbek i 100% dla negatywnych wyników.

		Wyniki innego testu MTB RT-PCR dopuszczonego do obrotu w Europie	
		wykryto	nie wykryto
Wyniki EURORealTime MTB	wykryto	69	0
	nie wykryto	3*	50

\*Te 3 próbki wykazały CP > 38 cyklu w teście RT-PCR innego producenta i negatywny wynik w badaniu mikroskopowym. Zgodnie ze wstępną charakterystyką są bardzo słabo pozytywne lub wątpliwe pozytywne.



Łatwe wdrożenie w laboratoriach genetycznych, które wykonują RT-PCR:




- walidacja na urządzeniach różnych producentów (Roche LightCycler 480II, ABI 7500 Fast)
- wszystkie wymagane **odczynniki** (w tym kontrola wewnętrzna i pozytywna kontrola zewnętrzna) zawarte w zestawie testowym
- automatyczna ocena dzięki programowi **EURORealTime Analysis** (nr kat. YG 0661-0101)

## Program EURORealTime Analysis:

- wsparcie procesu dzięki automatycznemu generowaniu rozkładu pipetowania
- zautomatyzowana analiza danych surowych, raportowanie oraz dokumentacja wyników i kontroli
- wsparcie użytkownika podczas całego procesu
- kompatybilny z różnymi cyklerami do RT-PCR i oprogramowaniem laboratoryjnym



## PCR vs. badanie mikroskopowe vs. hodowla

Metoda	Zalety	Wady
<b>PCR</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Szybka i czuła metoda</li><li>• Specyficzna dla bakterii <i>Mycobacterium tuberculosis</i></li><li>• Rekomendowana u pacjentów z podejrzeniem gruźlicy płuc, gdy szybko uzyskany wynik jest kluczowy</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Nie nadaje się do monitorowania skuteczności leczenia</li><li>• Wynik negatywny nie wyklucza infekcji prątkami niegruźliczymi</li><li>• Wynik negatywny nie wyklucza gruźlicy płuc</li></ul>
<b>Badanie mikroskopowe rozmazu płwociny</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Szybkie i tanie</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Czułość tylko 20–80%</li><li>• Często fałszywie negatywny wynik, szczególnie w przypadku próbek nie pochodzących z układu oddechowego</li><li>• Bez różnicowania pomiędzy prątkami gruźlicy a prątkami niegruźliczymi</li></ul>
<b>Hodowla</b> 	<ul style="list-style-type: none"><li>• Złoty standard w potwierdzaniu zakażenia TB</li><li>• Konieczna do badania lekowrażliwości i genotypowania</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 2–3 tygodnie do uzyskania pozytywnego wyniku i 8–12 tygodni do potwierdzenia negatywnego wyniku</li></ul>

Badanie PCR jest zalecane równolegle do hodowli/mikroskopii, ponieważ jest szybsze i bardziej czułe.

Polecane jest również do specjalnych rodzajów próbek, np. tkanki lub płyn mózgowo-rdzeniowy, u szczególnie narażonych pacjentów (pacjenci z AIDS, niemowlęta) oraz u osób w ciężkim stanie klinicznym.



## T-SPOT.TB – test do zadań specjalnych

T-SPOT.TB służy do diagnostyki latentnej postaci gruźlicy i opiera się na ocenie wytwarzania IFN- $\gamma$  przez limfocyty krwi obwodowej pobudzone antygenami prątka gruźlicy. Istnieją dwa rodzaje testów typu IGRA różniące się metodyką wykonania:

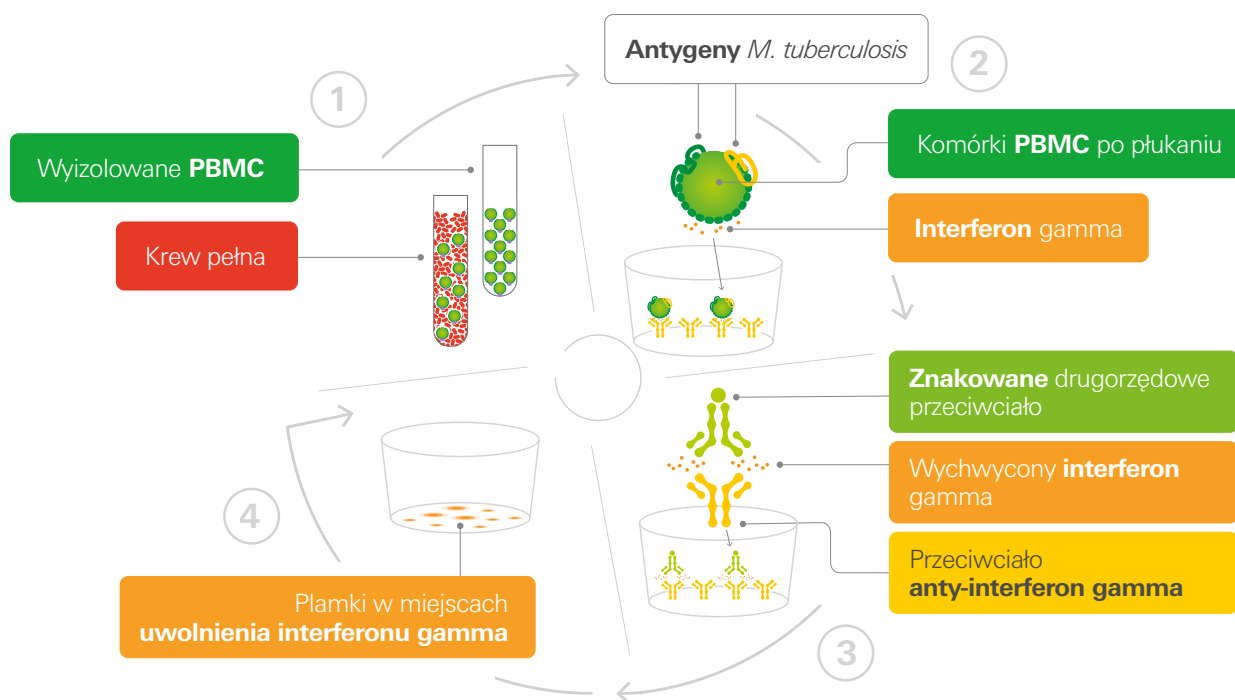
- Test polegający na policzeniu **metodą ELISPOT** limfocytów T produkujących IFN- $\gamma$  po swoistej stymulacji antygenami *M. tuberculosis*
- Test oparty na ocenie **metodą ELISA** ilości uwolnianego IFN- $\gamma$  w próbce krwi pełnej po stymulacji swoistymi antygenami *M. tuberculosis*

### Zasada działania metody ELISPOT

Metoda ELISPOT stanowi połączenie **techniki immunoenzymatycznej fazy stałej z krótkoterminową hodowlą komórkową**. Polega na stymulacji w warunkach *in vitro* limfocytów T, wyizolowanych z krwi obwodowej pacjenta, wysokospecyficznymi antygenami bakteryjnymi lub wirusowymi. W sytuacji wcześniejszego kontaktu z patogenem dochodzi do produkcji IFN- $\gamma$  przez komórki T, który przy użyciu przeciwciał wyznakowanych enzymatycznie można zwizualizować jako „plamki” na dnie studzienki płytki ELISPOT.

#### Procedura:

1. **Izolacja** jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC)
2. **Stymulacja** limfocytów T wysokospecyficznymi antygenami prątka gruźlicy (ESAT-6, CFP-10)
3. **Wyznakowanie wydzielonego IFN- $\gamma$**  przy wykorzystaniu znakowanych przeciwciał
4. **Jakościowa analiza** wydzielonego przez limfocyty T IFN- $\gamma$  – zliczanie „plamek”



Test T-SPOT.TB można przeprowadzić w sposób manualny, jak również istnieje **możliwość automatyzacji poszczególnych jego etapów**, takich jak izolacja i liczenie komórek PBMC oraz zliczanie „plamek” w celu interpretacji wyniku.

# Zalety testu T-SPOT.TB

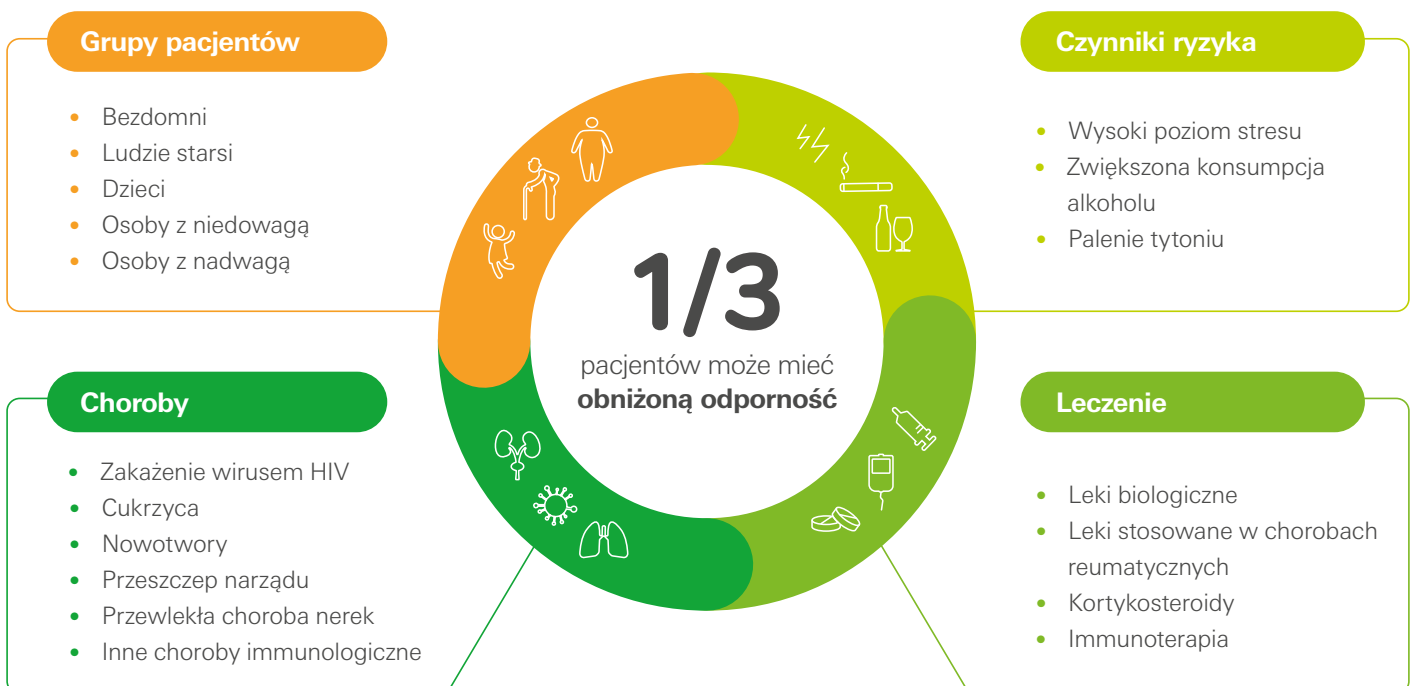
- Wysoka czułość i swoistość
- Wystandardyzowana liczba komórek dla każdego pacjenta
- Przemycanie komórek przed procesem inkubacji w celu pozbycia się interferujących czynników
- Pomiar bezpośredni – wynik testu nie zależy od krzywej standardowej
- Nawet do 54 godzin od momentu pobrania próbki krwi do procesu inkubacji
- Niski odsetek wyników granicznych (1,1%), dzięki czemu rzadko zachodzi konieczność ponownego wykonania testu
- Pojedyncza próbówka z antykoagulantem, wynik testu nie zależy od objętości próbki krwi w próbówce i jej wstrząsania podczas transportu
- Brak reakcji krzyżowych ze szczepionką BCG

## • Wiarygodne wyniki u pacjentów z obniżoną odpornością



T-SPOT.TB nazywany jest testem do zadań specjalnych i jest **szczególnie wskazany u pacjentów z grupy ryzyka ze względu na bardzo wysoką czułość**. W większości przypadków czułość testu T-SPOT.TB jest wyższa niż testu ELISA. Wpływają na to przede wszystkim: optymalizacja badania zarówno pod kątem liczby komórek, jak i warunków hodowli oraz niwelowanie interferującego wpływu czynników pochodzących z krwi, co sprawia, że **T-SPOT.TB jest najbardziej czułym i specyficznym testem do pomiaru odpowiedzi limfocytów T**.

## Pacjenci w immunosupresji



# Rekomendacje

---

## **Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: Diagnosis of Tuberculosis in Adults and Children, Clin Infect Dis. 2017**

**Jan 15; 64 (2): 111–115:**

- „Sugerujemy wykonanie testu NAAT (ang. *nucleic acid amplification test*, w tym PCR) z próbki pobranej z dróg oddechowych od pacjentów z podejrzeniem gruźlicy płuc”.
- „CDC zaleca wykonanie testu NAAT z co najmniej jednej próbki pobranej z dróg oddechowych od pacjenta z objawami gruźlicy płuc, u którego rozważane jest rozpoznanie gruźlicy, ale nie zostało ono jeszcze potwierdzone”.
- „Hodowla pozostaje złotym standardem laboratoryjnego potwierdzenia gruźlicy i jest wymagana do izolacji bakterii, do badania lekowrażliwości i genotypowania. Niemniej jednak testy NAAT powinny stać się standardową praktyką w diagnostyce pacjentów z podejrzeniem gruźlicy”.
- „Zalecamy wykonanie testu IGRA zamiast skórniego testu tuberkulinowego (TST) u osób w wieku 5 lat lub starszych [...]. Obecnie na rynku dostępne są 2 testy typu IGRA, które umożliwiają pomiar uwalniania interferonu gamma w odpowiedzi na antygeny specyficzne dla *Mtb*: QuantiFERON TB Gold In Tube (QFT-GIT; Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia) oraz test T-SPOT.TB (T-SPOT; Oxford Immunotec Ltd, Abingdon, Wielka Brytania)”.

## **Tuberculosis. NICE Guideline, data publikacji: 13.01.2016, ostatnia aktualizacja: 12.09.2019:**

- „W przypadku aktywnej gruźlicy zalecana jest hodowla”.
- „W przypadku gruźlicy płuc (w tym krtani):
  - Dorośli: badanie mikroskopowe rozmazu płwociny i hodowla. Zalecane jest stosowanie testów NAAT (w tym PCR) dla kompleksu *M. tuberculosis* na próbkach pierwotnych, jeżeli istnieje kliniczne podejrzenie gruźlicy lub jeżeli osoba jest zakażona wirusem HIV oraz w sytuacjach gdy informacja o gatunkach prątków wpłynie na sposób postępowania terapeutycznego z pacjentem.
  - Dzieci: testy NAAT (w tym PCR) dla kompleksu *M. tuberculosis*”.

## **Systematic screening for active tuberculosis: Principles and recommendations, Geneva, World Health Organization, 2013:**

- „Badania przesiewowe w kierunku aktywnej gruźlicy: badanie mikroskopowe rozmazu płwociny albo test molekularny (w tym PCR) o potwierdzonej wysokiej dokładności zarówno w przypadku rozmazu pozytywnego, jak i negatywnego”.
- „Hodowla to złoty standard w diagnostyce gruźlicy. Jednak w algorytmach przesiewowych nie jest brana pod uwagę, ponieważ wymaga większych zasobów i czasu (2–6 tygodni). Metody NAAT (w tym PCR) i badanie mikroskopowe rozmazu płwociny dostarczają wyniki w mniej niż 1 dzień”.

Schaberg T. et al., **Tuberculosis Guideline for Adults. Guideline for Diagnosis and Treatment of tuberculosis including LTBI Testing and Treatment of the German Central Committee (DZK) and the German Respiratory Society (DGP)**, Pneumologie 2017; 71: 325–397:



- „Badanie mikroskopowe jest najszybszą i najtańszą metodą diagnostyczną do wykrywania *Mycobacterium*, ale jej czułość wynosi tylko 20–80%. W przypadku próbek z dróg oddechowych badanie mikroskopowe często daje wyniki fałszywie ujemne, a ponadto nie rozróżnia prątków gruźlicy od prątków niegruźliczych (NTM, *Nontuberculosis mycobacteria*)”.
- „Hodowla to złoty standard w badaniach przesiewowych MTB. Jednak czas do uzyskania wyniku wynosi od 3 do 8 tygodni, a gdy próbki nie zawierają wystarczającej ilości materiału, potwierdzenie negatywnego wyniku może potrwać do 12 tygodni”.
- „Testy PCR są szybsze i czulsze:
  - w przypadku próbek z rozmazem dodatnim czułość i swoistość wynosi prawie 100% (w zależności od testu),
  - negatywny wynik PCR z próbki z rozmazem dodatnim prowadzi zatem do wniosku, że pacjent jest zainfekowany NTM”.

#### **Tuberkuloze. RKI-Ratgeber, Robert-Koch Institute:**

- „Testy NAAT (w tym PCR) są zalecane w przypadku silnego podejrzenia gruźlicy i negatywnego rozmazu płwociny w szczególności u pacjentów z grup ryzyka, a także przy ciężkim przebiegu choroby, ponieważ pozwalają na uzyskanie wyniku w krótkim czasie. Ponadto testy NAAT (w tym PCR) są zalecane dla próbek płwociny rozmazowo-dodatnich w celu szybkiego różnicowania między zakażeniami prątkami niegruźliczymi (NTM) i gruźliczymi”.

#### **Augustynowicz-Kopeć E. et al., *Zalecenia Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc dotyczące rozpoznawania, leczenia i zapobiegania gruźlicy u dorosłych i dzieci*, 2013:**

- „W diagnostyce utajonego zakażenia prątkiem gruźlicy u dorosłych i dzieci powyżej 5. roku życia, bez zaburzeń odporności, zaleca się stosowanie testów IGRA lub OT [AIII]”.
- „Opracowano dwa rodzaje testów różniące się metodyką wykonania: [...] test polegający na policzeniu u osoby badanej komórek z krwi obwodowej produkujących IFN- $\gamma$  po swoistej stymulacji antygenami prątka gruźlicy metodą ELISPOT (T-SPOT.TB)”.

#### **Sosa E.L. et al., *Tuberculosis Screening, Testing, and Treatment of U.S. Health Care Personnel: Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC*, 2019:**

- „Badanie przesiewowe gruźlicy definiuje się jako proces obejmujący ocenę ryzyka wystąpienia gruźlicy, scharakteryzowanie ewentualnych objawów, testy na gruźlicę w kierunku zakażenia *M. tuberculosis* (IGRA lub TST) [...]”.

#### ***Guidelines for Screening for Tuberculosis Infection and Disease during the Domestic Medical Examination for Newly Arrived Refugees*, 2019:**

- „Za granicą CDC zezwala na stosowanie wyłącznie testów typu IGRA zatwierdzonych przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA). Obecnie QIAGEN QuantiFERON® [...] lub Oxford Immunotec T-SPOT®.TB to jedyne testy zatwierdzone przez FDA”.

