

Tüberküloz laboratuvarımıza gönderilen T-Spot. TB test sonuçlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi

Retrospective evaluation of T-Spot. TB test results that sent to our tuberculosis laboratory

Yeliz Tanrıverdi Çaycı, Ferhan Korkmaz, Asuman Birinci

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun

Geliş Tarihi: 17.03.2016

Kabul Tarihi: 25.06.2016

DOI: 10.21601/ortadogutipdergisi.293217

Öz

Amaç: T-Spot.TB testi tüberkülozun tanısında kullanılan ve interferon gamma salınımına dayanan bir testtir. Bu testte hastanın lenfositlerinin tüberküloz spesifik antijenlerle (ESAT-6 ve CFP10) uyarımını takiben T-lenfositlerinden interferon gamma üretimi ölçülmektedir. Çalışmamızda Tüberküloz Laboratuvarına gönderilmiş olan serum örneklerinde T-Spot.TB sonuçlarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüberküloz Laboratuvarına Aralık 2013-Mart 2015 yılları arasında gönderilmiş olan klinik örnekler retrospektif olarak incelenmiştir. Serum örnekleri heparinli tüpe 6 ml olacak şekilde alınmış ve laboratuvarımıza gönderilmiş ve üretici firma önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Bu testte yıkanmış ve sayılmış periferik mononükleer hücrelerde, tüberküloz spesifik antijenlerle (ESAT-6 ve CFP10) uyarımını takiben interferon gamma üretimi ölçülmektedir. Spotlar sayılmakta, 6 ve üzeri pozitif olarak kabul edilmektedir.

Bulgular: Toplam 141 hastanın serum örneği çalışılmıştır, serum örneği gönderilmiş olan hastaların yaş ortalaması 33.03 (9 aylık-83 yaş) olarak saptanmıştır. Bu örneklerden 28 hasta örneğinde T-Spot.TB pozitifliği görülmüştür. T-Spot.TB pozitifliği görülen hastalardan 18 (%64,2) hastada EZN boyama, tüberküloz kültürü ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) testleri istenmemiş olup sadece T-Spot.TB çalışılmıştır. T-Spot.TB çalışılmış olan 141 örneğin 3 (%2,1) tanesinde kültür pozitifliği saptanmış olup, hem kültür hem T-Spot.TB pozitifliği sadece 2 (%1,4) hastada saptanmıştır.

Sonuç: T-Spot.TB testinde BCG aşılınması ve çevresel mikobakterilerle maruziyete bağlı yalancı pozitiflik görülmemesi bu testi, tüberkülin deri testiyle kıyaslandığında ön plana çıkartmaktadır. Ayrıca latent tüberküloz enfeksiyonu tanısında daha özgül ve duyarlı olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle bu testin ilerleyen dönemlerde daha ön plana çıkacağını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Latent tüberküloz enfeksiyonu, tanı, T-Spot.TB, IGRA

Abstract

Aim: T-Spot.TB test is a test used for the diagnosis of tuberculosis and based on interferon gamma release. In this test, with following stimulation of tuberculosis specific antigens of the patient's lymphocytes (ESAT-6 and CFP10) interferon gamma production from T-lymphocytes is measured. In our study, it is aimed to investigate the T-Spot. TB result in serum samples which were sent to the Tuberculosis Laboratory.

Materials and Methods: Clinical specimens which were sent to Ondokuz Mayıs University Medical Faculty Hospital tuberculosis laboratory between December 2013- March 2015 were analyzed retrospectively. Serum samples were taken to be 6 ml heparin tubes and sent to our laboratory and has been tested in accordance with manufacturer recommendations. This assay used, early secreted antigenic target 6-kDa protein (ESAT-6) and culture filtrate protein 10 (CFP10), to stimulate interferon-production in washed and enumerated peripheral blood mononuclear cells. Spots were counted and assays with 6 or more spots were considered positive.

Results: A total of 141 patient's serum samples were studied, the average age of patients whose serum samples were sent is detected 33.03 (9 months-83 yearsold). Twentyeight patients in the case of this example, the T-Spot.TB positivity was observed. In 18 patients (64.2%) who has positivity of T-Spot.TB, EZN staining, tuberculosis culture and polymerase chain reaction (PCR) were not tested, only the T-Spot.TB has been studied. Three (2.1%) of 141 samples which was studied is detected culture positive, both culture positivity and the T-Spot.TB positivity was detected in only 2 (1.4%) patients.

Conclusion: In T-Spot.TB test, false positive results is not seen like BCG vaccination and exposure to environmental mycobacterias and forefront this test when compared with the tuberculin skin test. Also it is indicated to be more independent and responsive in the diagnosis of latent tuberculosis infection. Therefore we think that this test will be more forefront in the forthcoming years.

Keywords: Latent tuberculosis infection, diagnosis, T-Spot.TB, IGRA

Giriş

Mycobacterium tuberculosis zorunlu aerob, aside dirençli basildir. Basil aktif hastalığa neden olmakla beraber latent de kalabilmektedir [1]. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2014 verilerine göre dünyada dokuz milyon tüberküloz (TB) hastası ve iki milyardan fazla latent tüberküloz enfeksiyonlu (LTE) kişi vardır [2]. LTE 'li semptomsuz bireylerin %10'unda aktif tüberküloz gelişebilmektedir [3]. Koruyucu ilaç tedavisi ile LTE'li bireylerden aktif hastalık gelişme riski %75-90 oranında azalmaktadır [4]. Bu sebepten dolayı LTE'li bireylerin tanısı ve tedavisi büyük önem taşımaktadır. TNF-alfa antagonisti ilaçlar birçok inflamatuvar hastalıkta son seçenek tedavi olarak kullanılmaktadır. TNF-alfa antagonisti ilaçların kullanımında tüberküloz riski ön plandadır. Ülkemizde 2002'de Romatoloji Araştırma ve Eğitim Derneği (RAED) ve Göğüs hastalıkları uzmanları ile İstanbul'da oluşturulan kılavuzda anti-TNF tedavisi başlanması düşünülen her hastada, anamnez, akciğer grafisi ve TCT (PPD) ile latent TB varlığı araştırılmalı ve dışlanmalıdır kararı yer almıştır. Günümüzde TB hastalığını dışlamakta sorun olmamasına karşılık LTE'yi belirlemek özellikle de immünsüpresif kişilerde zordur. Bu grup hastalarda

TB riski yüksek olduğu için LTE'un belirlenmesi ve profilaksi uygulanması önemlidir [5]. Tüberküloz basilinin saflaştırılmış protein türevi (PPD), M. tuberculosis, Mycobacterium bovis, Bacillus-Calmette-Guerin (BCG) suşu ve pek çok tüberküloz dışı mikobakterilerce (non-tuberculosis mycobacteria (NTM)) paylaşılan kaba bir antijen karışımıdır [6]. Kullanılan antijenin NTM ve BCG'de bulunması PPD'nin özgüllüğünü düşürmektedir. İmmünsüpresyon, malnutrisyon, miliyer tüberküloz, viral enfeksiyon, viral aşilar, ileri yaş gibi durumlar testin duyarlılığını düşürmektedir. Ayrıca hastanın test için hastanın iki kez çağırılması gerekliliği, hem testin uygulama aşamasının hem de değerlendirme aşamasının subjektif olması testi olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle son yıllarda LTE tespiti için farklı test arayışları içine girilmiştir. Bu testler T-Spot testi ve interferon gama salınım testleridir. Son 20 yıl içinde M. tuberculosis genomunda olan, Region of Difference-1 (RD-1) bölgesi tanımlanmıştır [7]. Bu DNA bölgesinde iki protein kodlanmaktadır; "Early Secretory Antigenic Target-6" (ESAT-6) ve "Culture Filtrate Protein-10" (CFP-10). Bu antijenler M. marinum, M. kansasii, M. szulgai ve M. flavescens dışındaki tüberküloz dışı mikobakterilerin çoğunda ve BCG aşısı kökeninde bulunmamaktadır [8].

T-Spot.TB testinde hastanın lenfositlerinin tüberküloz spesifik antijenlerle (ESAT-6 ve CFP10) uyarımını takiben T-lenfositlerinden interferon gamma üretimi ölçülmektedir. Bu antijenlerin NTM ve BCG'de bulunmaması T-Spot.TB testinin özgülüğünü artırmaktadır. T-Spot.TB testine benzer IFN-gama ölçümüne dayalı başka testlerde bulunmaktadır.

Çalışmamızda Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tüberküloz Laboratuvarına gönderilmiş olan serum örneklerinde T-Spot.TB sonuçlarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüberküloz Laboratuvarı'na Aralık 2013- Mart 2015 yılları arasında gönderilmiş olan klinik örnekler retrospektif olarak incelenmiştir. Analiz için T.Spot.TB (Oxford, Immunotec, İngiltere) kiti kullanılmıştır. Testte heparinli tüplere alınmış serum örnekleri çalışılmaktadır. Örnek laboratuvarında işleme alındığında, serum steril plastik bir kaba alınarak üzerine 150 µl T-cellxtend eklenir ve oda ısısında bir süre beklendikten sonra bir dizi santrifüj işleminden geçirilerek mononükleer hücreler serumdan izole edilir. Elde edilen süspansiyon antijen kaplı 4 kuyucuklu plağına alınır. Bu kuyucuklarda pozitif kontrol, negatif kontrol, Panel A ve Panel B bakılır. Hazırlanan plak 37 C'de %5'lik CO2 etüvde 16-20 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra bir dizi yıkama, konjugat ve substrat ekleme işleminden sonra kamera yardımıyla spotlar incelenir. Altı veya daha fazla spot görülmesi T-Spot.TB pozitifliği olarak değerlendirilir.

Bulgular

Toplam 141 hastaya ait serum örneği çalışılmıştır, serum örneği gönderilmiş olan hastaların yaş ortalaması 33.03 (9 aylık-83 yaş) olarak saptanmıştır. Bu örneklerden 28'inde (%19,8) T-Spot.TB pozitifliği görülmüştür. T-Spot.TB pozitifliği görülen hastalardan 18 (%64,2) hastada EZN boyama, tüberküloz kültürü ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) testleri istenmemiş olup sadece T-Spot.TB çalışılmıştır. T-Spot.TB çalışılmış olan 141 örneğin 3 (%2,1)'ünde kültür pozitifliği saptanmış olup, hem kültür hem T-Spot.TB pozitifliği sadece 2 (%1,4) hastada saptanmıştır. Çalışılan serum örneklerinin pozitif ve negatifliklerine göre servis dağılımları Tablo 1'de verilmiştir. Kültür pozitifliği ve negatifliğine göre T-Spot TB test sonuçları ise Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. T-Spot.TB çalışılmış hasta örneklerinin kliniklere göre dağılımları.

Klinik	Pozitif	Toplam
Romatoloji	14	67
Pediyatri	4	31
Nefroloji	2	11
Enfeksiyon	2	9
Genel Cer.	1	7
Gastroloji	1	5
Göğüs Has.	2	3
Onkoloji	0	2
Üroloji	0	2
Nöroloji	0	1
Koroner	1	1
Hematoloji	0	1
Dahiliye	1	1
Toplam	28	141

Tablo 2. Kültür pozitifliği ve negatifliğine göre T-Spot. TB test sonuçlarının değerlendirilmesi

	Kültür(+)	Kültür(-)
Tspot TB(+)	2	8
T spot TB(-)	1	32
Toplam	3	40

T-Spot.TB çalışılması için en fazla örnek, romatoloji servisinde (n:67, %47,5) gönderilirken, romatolojiyi pediatri (n:31, %21,9) ve nefroloji (n:11, %7,8) servisleri takip etmiştir. Pozitif 28 örneğin 14'ü (%50) romatoloji servisinde gelmiştir.

T-Spot.TB testi pozitif saptanmış olan 28 hastadan; 15 romatoloji hastasının 13'ünde, 1 kardiyoloji hastasında ve 2 nefroloji hastasında immünespresif tedavi öncesi latent tüberkülozü ekarte etmek için T-Spot.TB testi istendiği saptanmıştır. Çocuk enfeksiyon hastalıkları servisinde bir hastada enfeksiyon odağı bulunmadığı ve tüberküloz aile öyküsü olduğu için T-Spot.TB istendiği görülmüştür. Geriye kalan 11 hastada tüberküloz semptomları görüldüğü için T-Spot.TB testi istenmiştir.

T-Spot.TB pozitifliği görülen 28 hastanın 15'ine PPD testi yapılmıştır. Dört hastada PPD 5 mm'nin altında iken 6 hastada 6-14 mm arası, 5 hastada ise 15 mm'nin üzerinde olduğu saptanmıştır. PPD'si 15 mm'nin üstünde olan 3 hastanın, immünespresif tedavi alacak olan romatoloji hastası, böbrek nakli yapılacak nefroloji hastası ve tüberküloz tanısı almış olan pediatri hastası olduğu görülmüştür. T-Spot.TB pozitifliği görülen 28 hastadan 5'ine aktif tüberküloz tanısı konmuş ve tedavi başlanmıştır.

Tartışma

T-Spot.TB test, LTE tanısında kullanılan periferik kan mononükleer hücrelerin, in vitro koşullarda, özgül antijenlerle uyarıldığına IFN-gama salınan T-hücrelerin sayısının çift sandviç ELISA yöntemi ile belirlenmesine dayalı bir yöntemdir. Bu test ve bu testin bir diğer alternatifi olan Quantiferon Gold-Tb testi son yıllarda LTE tanısında tüberkülin cilt testi (PPD)'nin alternatifi olup, duyarlılık ve özgüllükleri PPD cilt testinden daha yüksektir [5].

Sunduğumuz çalışmada kültür pozitifliği saptanan 3 hastanın 2'sinde T-Spot.TB pozitifliği saptanmıştır. T-Spot.TB pozitifliği görülen 28 hastadan 5'ine aktif tüberküloz tanısı konmuştur. Meier ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 72 akciğer ve akciğer dışı TB hastaların 70'inde T-Spot.TB pozitifliği saptandığı görülmüştür [9]. Cruz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kültür ile doğrulanmış tüberküloz hastalığı olan çocuklarda PPD ve T-Spot.TB duyarlılığın sırasıyla %77 ve %92 olduğu ve T-Spot.TB testinin BCG yapılmış olan hastalarda daha spesifik olduğu görülmüştür [10].

Chapman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada T-Spot. TB testinin HIV negatif hastalarda %100 duyarlılığa, HIV pozitif hastalarda %90 duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür [11], Brock ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, aşısızlarda RD1'e dayalı testler için %100 özgüllük, aşılılarda ise %89 özgüllük saptamışlardır [12]. IFN-gama salınımına dayalı T-Spot.TB testi RD1 genindeki antijene özgü olduğundan birçok NTM ve BCG antijeni ile çapraz reaksiyon vermeyeceğinden dolayı testin özgüllüğü yüksektir. Böylece gereksiz tedavi, ilaç yan etkileri ve maliyet azaltılmış olacaktır. İmmünespresif hastalık, malnutrisyon, ileri TB, yaşlılık, viral enfeksiyon, viral aşılar, TNF-alfa öncesi immünespresif tedaviden az etkilenmesi testin duyarlılığını artırır. Bu gibi durumlarda LTE'nunu saptaması tedaviyi yönlendirir veya ilerde bu hastanın TB olma ihtimalini güçlendirir. Hastanın bir kez gelmesi, daha kısa sürede sonuçlanması da testin avantajlarından. Maliyetin daha yüksek olması ise testin dezavantajıdır.

Sonuç olarak, T-Spot.TB testi tüberkülin cilt testine göre duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması nedeniyle özel hasta gruplarında (TNF-alfa blokörü kullanacaklar, immünespresif hastalar vb.) kullanılması uygun olacaktır. Çıkar Çatışması: Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların herhangi bir çıkar dayalı ilişkisi yoktur.

Kaynaklar

1. Levinson W, Jawets E. Lange Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. Mikobakteriler. Editör: Özgünen T. 2006, Ankara: Güneş Tıp Kitabevi p:159-165.
2. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (Erişim Tarihi: Mayıs 2015)
3. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: Mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 578-90.
4. Herrera V, Perry S, Parsonnet J, Banaei N. Clinical applications and limitations of interferon gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection. *Clin Infect Dis* 2011;52:1031-7.
5. Çağatay T. TNF-a Antagonisti Kullanacak Hastalarda Latent Tüberkülozun Belirlenmesinde IGRA Testleri (Quantiferon-Elispot) ve PPD'nin Yeri. *Turk J Dermatol* 2012; 6: 62-4.
6. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000; 356: 1099-104.
7. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 1996; 178:1274-82.
8. Pai M, Denkinger CM, Kik SV et al. Gamma interferon release assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27:3-20.
9. Meier T, Eulenbruch HP, Wrighton SP, Enders G, Regnath T. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T.SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2005) 24: 529-536.
10. Cruz AT, Geltemeyer AM, Starke JR, Flores JA, Graviss EA, Smith KC. Comparing the Tuberculin Skin Test and T-SPOT.TB Blood Test in Children, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. North American Region; 2007. *Pediatrics*, 2011;127:e31-8.
11. Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells. *AIDS* 2002; 16: 2285-9.
12. Brock I, Munk ME, Kok JA, Andersen P. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5: 462-7.

Sorumlu yazar: Yeliz Tanrıverdi Çaycı,
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD Atakum-Samsun
İletişim: E-mail:yeliztanriverdi@gmail.com