

Nový způsob detekce latentní tuberkulózy

(Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak)

Ewer Katie, Deeks J., Alvarez Lydia, Bryant G. aj.
Volně přeložil a zkrátil MUDr. Vladimír Plesník

Úvod

Odhalení a léčba osob s latentní tuberkulózou pomocí tuberkulinového testu a profylaxe jsou dva základní kameny kontroly tuberkulózy (tbc) ve vyspělých zemích. Hlavní nevýhodou kožního tuberkulinového testu (TT) je jeho malá specifita, protože k falešně pozitivnímu výsledku testu dochází i po dřívějším očkování BCG vakcínou z *Mycob. bovis* a po expozici mykobakteriím ze zevního prostředí. Větší polovina případů tbc ve vyspělých zemích je nalézána u přistěhovalců z oblastí s vysokou prevalencí tbc, kde je očkování BCG vakcínou a expozice mykobakteriím v životním prostředí zcela běžná. Tuberkulinové testy mají také některé organizační nevýhody, včetně nezbytnosti opětovné návštěvy ke kontrole positivity reakce, nebo variability posuzování reakce různými pracovníky. Prioritou zlepšování kontroly tbc je proto vypracování a zavedení přesnějšího a rychlého testu k průkazu latentní tbc.

Určení genů v genomu *M tuberculosis*, které nejsou obsaženy v BCG a ve většině mykobakterií ze zevního prostředí, poskytlo možnost vyvinout specifitější testy k průkazu infekce *M tuberculosis*. Vybrány byly dva geny, vyvolávající u pacientů s tbc a jejich kontaktů silnou reakci buněčné imunity: ESAT-6 (early secretory antigen target-6) a CFP10 (culture filtrate protein 10). Přítomnost ESAT-6-specifických T buněk, zjišťovaná expresním testem ELISPOT (enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma), je velmi citlivým a specifickým ukazatelem infekce *M tuberculosis* u pacientů s kultivačně ověřenou tbc. Citlivost tohoto nového testu je podstatně vyšší, než citlivost tuberkulinových testů.

V únoru 2001 se objevila unikátní příležitost porovnat záchytnost ELISPOTu s TT. U studenta, trpícího po 9 měsících chronickým kašlem, byla kultivačně prokázána tbc s kavernou plic. Zdravotníci testovali 1128 z celkového počtu 1208 studentů školy pomocí TT a při tom našli 69 kontaktních případů aktivní tbc a 254 případů latentní tbc infekce. Protože frekvence přenosu zárodků tbc vzduchem se zvyšuje s trváním a těsností kontaktu se zdrojem nákazy, určujícím hlediskem nákazy je délka času, po který osoby dýchaly stejný vzduch v místnosti se zdrojem. Stanovili hypotézu, že je-li ELISPOT citlivější a specifitější než TT, měla by jeho pozitivita těsněji korelovat s intenzitou expozice *M tuberculosis* než u TT a neměla by být závislá na dřívějším očkování BCG vakcínou. Intenzitu expozice hodnotili dle dvou kritérií: a) kontaktu se zdrojem ve škole a třídě a b) délky pobytu ve třídě nemocného. Mezi okolnostmi, které přispěly k hodnověrnosti výsledků tohoto epidemiologického šetření, patřilo velké množství kontaktů jediného možného zdroje nákazy, vznik epidemie v uzavřeném kolektivu a školní rozvrh, umožňující přesné určení doby, po kterou každý student dýchal vzduch v prostorách, v nichž pobýval nemocný tbc.

Účastníci a metodika

K účasti na studii vyzvali 963 studenty ve věku 11-15 let navštěvující stejnou školu jako nemocný. Získali podpisy Informovaného souhlasu s účastí ve studii od 594 (62 %) studentů a jejich rodičů. V květnu a červnu 2001 sepsaly pracovníce „školní zdravotní služby“ anamnézu od 550 studentů (57 % ze všech vyzvaných), týkající se místa jejich narození a

možné expozice tbc mimo školu. Současně odebraly do heparinizovaných nádobek vzorky 10 ml krve, které byly uloženy pod pořadovým číslem.

Kožní TT prováděli standardním testem mnohočetných vpichů pomocí pistole s výměnnými šestijehlovými hlavicemi. V souladu s platnými směrnici aplikovali koncentrovaný, purifikovaný tuberkulinový protein, obsahující 100 000 TU/ml. TT vykonali a odečítali sami pracovníci protiepidemického týmu. Velikost zduření kůže hodnotili po týdnu ve čtyřech stupních od 0 do 4. I když takové odečítání výsledku je méně přesné, než měření indurace v milimetrech, korelace obou testů byla dobrá.

Testem ELISPOT vyšetřili krev 545 z 550 studentů během 2-4 hodin po odběru krve. Rychlé zpracování umožnil jednodušší postup využívající destiček-nosičů monoklonálních protilátek proti interferonu gamma a detektor monoklonálních protilátek vůči interferonu gamma konjugovanému na alkalickou fosfatázou. Destičky během noci inkubovali při 37° C v ovzduší s 5 % CO₂, vyvolali pomocí chromogenní látky a odečítali automatickým detektorem.

U studentů se suspektními potížemi udělali bez ohledu na výsledky kožních testů ještě rtg snímek plic a klinické vyšetření.

Demografické složení souboru a výsledky epid. šetření

Průměrný věk	13.1 (11-15)	Očkování BCG	467 (87,3%)
Muži – ženy	267/268	Reakce TT po 10 TU Mantoux	
Postupný ročník : 7	152 (28,4 %)	- negativní (stupeň 0) <5 mm	141 (26,4 %)
8	132 (24,9 %)	- - stupeň 1 (<5 mm)	129 (24,1 %)
9	148 (27,7 %)	- - 2 (5-14 mm) a očk.BCG	110 (20,6 %)
10	103 (19,8 %)	- pozitivní	
Rodin. anamnéza kontaktu s tbc+	36 (6,7 %)	- - stupeň 2 (5-14 mm) a neočk.BCG	10 (1,9 %)
Narozen v endem.oblasti tbc	76 (14,2 %)	- - 3 (> 15 mm)	83 (15,5 %)
Etnický původ: Indové	436 (81,5 %)	- - 4 (> 15 mm)	62 (11,5 %)
- Pakistanci	35 (6,5 %)		
- Běloši	19 (3,6 %)	Diagnosa dle konvenčních kritérií :	
- Míšenci	19 (3,6 %)		
- černí Afričané	12 (2,2 %)	- latentní tuberkulóza	128 (23,9 %)
- Karibští indiáni	7 (1,3 %)	- aktivní tuberkulóza	27 (5,0 %)
- ostatní	7 (1,3 %)		

Hodnocení expozice nákaze tbc

Studenty zařadili do čtyř skupin podle klesajícího rizika expozice nemocnému index case. Přihlíželi k vzájemnému styku a společné školní činnosti: spolužáci ve třídě; studenti stejného ročníku, kteří pravidelně pobývali v téže třídě jako index case; studenti stejného ročníku, kteří do třídy nemocného chodili zřídka; studenti ostatních ročníků školy, kteří se nezúčastnili žádné školní činnosti s index case. Využili záznamy o případné absenci v třídní knize a rozvrhu ke stanovení délky vzájemného styku.

Výsledky

Relativní pravděpodobnost souvislosti výsledku ELISPOTu a TT s intenzitou expozice *Mycobacterium tuberculosis* ve škole a mimo školu

	ELISPOT	p	Tub.test	p	Tt vs ELISPOT
Expozice ve škole					
- všech studentů ve škole, N=535	2,78	<0,0001	2,33	<0,0001	0,03
- přímá expozice 9.ročníku, n=148	2,51	<0,0001	1,30	<0,002	0,007
- nepř. expozice 7.+8.+10.ročníku, n= 387	1,87	0,11	1,63	0,20	0,69

Expozice mimo školu

- anamnéza o tbc v rodině, n=36	1,99	0,05	2,34	0,02	0,61
- původ ze země s vysokou prevalencí tbc, n=76	1,17	0,56	1,74	0,03	0,09

Diskuse

Protože nám chybí spolehlivý standardní test k průkazu latentní tbc nelze přímo porovnat citlivost a specifčnost ELISPOTu a Tuberkulinového testu (TT). Vyjdeme-li však z faktu, že pravděpodobnost latentní infekce tbc je dána velikostí expozice *M tuberculosis*, můžeme ohodnotit tyto testy podle přesnosti stanovení diagnózy. Shoda výsledků těchto testů byla vysoká, ale přece odlišný výsledek u 11 % studentů svědčí o tom, že testy si nejsou rovnocenné. Naše výsledky ukazují, že ELISPOT má asi vyšší citlivost i specifčnost než TT. Signifikantně užší korelace ELISPOTu než TT s velikostí expozice naznačuje, že ELISPOT je citlivější pro záchyt latentní infekce *M tuberculosis*. TT, ne však ELISPOT, byl ovlivňován BCG vakcinací i v případech, že od očkování uplynulo 11-15 let, což svědčí o vyšší specifčnosti ELISPOTu.

Oba testy byly častěji pozitivní u studentů, kteří uvedli v anamnéze kontakt s tbc v rodině. Naopak, u studentů pocházejících ze zemí s vysokou prevalencí TBC, hlavně z Afriky a Asie, kde je také navíc riziko expozice mykobakteriím ze zevního prostředí, pouze TT byl signifikantně častěji pozitivní. Velikost reakce TT stoupala s vyšší nemocností tbc během doby studie. Zdá se, že ELISPOT zachytil navíc skupinu TT pozitivních osob, které právě prožívaly latentní tuberkulózní nákazu. Tato skupina se lišila od osob se slabě pozitivním TT, který představoval falešně pozitivní nález následkem zkřížené reakce antigenů environmentálních mykobakterií s PPD tuberkulinem. Studenti s pozitivním výsledkem ELISPOTu měli podstatně větší expozici *M tuberculosis*, než studenti s negativním výsledkem. Tato vyšší specifčnost ELISPOTu může zabránit případům zbytečné chemoprophylaxe u neinfikovaných osob. Odhalení falešně pozitivních výsledků TT je ještě důležitější v zemích s nízkou prevalencí tbc. V cizině mnohem častěji užívaný test Mantoux však musí být porovnán s ELISPOTem samostatně. Zkřížené reakce PPD mohou být vysvětlením proč nový ELISA-test, používající PPD, je ovlivněn očkováním BCG.

Bylo spolehlivě prokázáno, že studovanou epidemii vyvolal jediný pacient-index case, který byl prvním nemocným s plicní formou tbc ve škole. Výsledky molekulární epidemiologie izolátů *M tuberculosis* také svědčí o tom, že to byl zdroj celé epidemie. Pouze dva další studenti byli potenciálně nakažliví. Oba byli nemocní méně než dva týdny před hospitalizací a oba navštěvovali 11. ročník, který se na studii nepodílel. Od nich izolované kmeny *M tuberculosis* byly podle čtyř použitých typizačních metod naprosto identické s kmenem od index case.

Neví se, jak velká musí být expozice aby došlo k přenosu *M tuberculosis* od nakažlivé osoby. Nemůže však být velká, protože řada dobře doložených případů infekce vznikla po krátké expozici a řada studentů, kteří se nezúčastnili vyučování s index case, se také infikovala ve škole. Naše nálezy naznačují, že jistě dojde k nákaze po 130 hodinách dýchání vzduchu v místnosti spolu s osobou trpící kavitární tbc s BK pozitivitou ve sputu.

Kvantitativní výsledky ELISPOTu jsou k dispozici ráno druhého dne po odběru krve. Jsou objektivnější, přesnější a rychlejší než výsledky TT. I když samotný TT je levný, s ohledem na nepřímé náklady spojené s potřebou opakované návštěvy ke kontrole výsledku, na nezbytnou přítomnost kvalifikovaného personálu k aplikaci a k odečtení testu, se vyšetření pomocí TT prodrazí. Zavedení ELISPOTu může zpočátku zvýšit náklady na kontrolu tbc, ale úspory plynoucí z přesnější diagnostiky latentní tbc mohou být z dlouhodobějšího hlediska velmi výhodné ekonomicky. Lepší detekce latentní nákazy sníží počet případů aktivní tbc a tím i příslušné náklady na diagnostiku, hospitalizaci a depistáž kontaktů. Méně falešně pozitivních výsledků u neinfikovaných kontaktů může ušetřit náklady na zbytečnou chemoprophylaxi a s ní spojené zdravotní problémy.