

5 METÓDY POUŽÍVANÉ NA VYŠETRENIE ZLOŽIEK BUNKOVEJ IMUNITY

5.1 DÔKAZ ŠPECIFICKEJ BUNKOVEJ IMUNITY, METÓDY POUŽÍVANÉ IN VIVO A IN VITRO PRI DIAGNOSTIKE TUBERKULÓZY

Tuberkulóza je chronicky prebiehajúca infekčná choroba, ktorá je vyvolaná predovšetkým (až v 95 % prípadov) acidorezistentnými baktériami *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Cieľovým orgánom sú hlavne pľúca (pľúcna tuberkulóza), ale môžu spôsobiť chorobný proces aj v mimopľúcnej lokalizácii (mimopľúcna – extrapulmonálna tuberkulóza).

Latentná (subklinická) tuberkulózná infekcia znamená usídlenie tuberkulózných mykobaktérií v organizme, ktoré však nevyvolávajú klinicky manifestnú infekciu. Len okolo 10 -15 % latentne infikovaných osôb skutočne ochorie na aktívnu tuberkulózu. Vznik aktívnej formy tuberkulózy z latentnej formy môže trvať niekoľko desiatok rokov za podmienok, kedy dôjde z rôznych dôvodov k oslabeniu funkcie obranných mechanizmov.

Latentná tuberkulózná infekcia predstavuje v krajinách s nízkou incidenciou tuberkulózy rezervoár vzniku nových tuberkulózných infekcií. Postihuje približne 1/3 ľudstva a je ďalším zdrojom tuberkulóznej infekcie hlavne pri oslabení obranných funkcií organizmu – imunosupresii. Identifikáciou a preventívnou liečbou sa môže znížiť počet ochorení na tuberkulózu a tak zabrániť ďalšiemu šíreniu tuberkulózy v populácii.

Na identifikáciu latentných foriem tuberkulózy bol medzinárodne prijatý postup, kedy sa v krajinách s povinnou BCG vakcináciou populácie vykonáva okrem štandardných diagnostických postupov aj vyšetrenie imunologické.

Medzi **štandardné diagnostické postupy** sú zaradené:

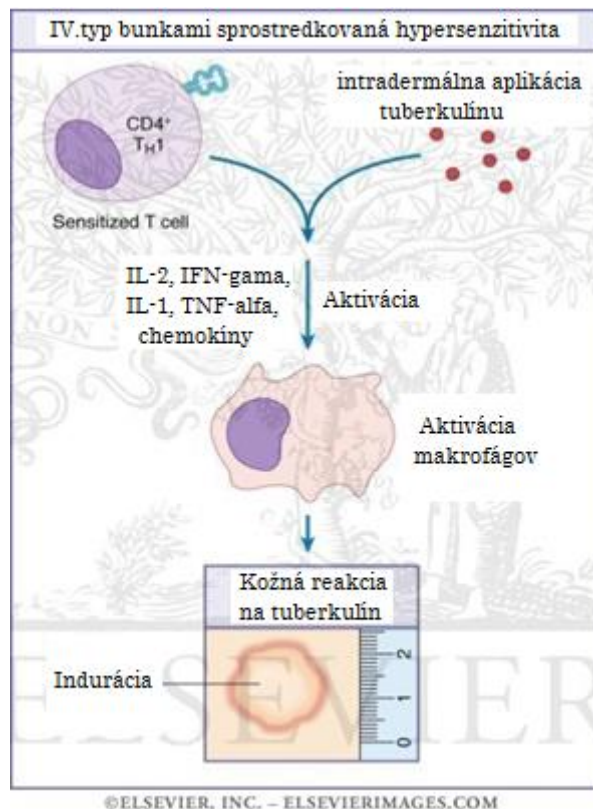
- klinické vyšetrenie
- rtg vyšetrenie
- bakteriologické vyšetrenie
- kožný tuberkulínový test

Imunologické vyšetrenie – IGRA testy (Interferón Gamma Release Assay) sa vykonávajú u kontaktov (hlavne zdravotníckych pracovníkov vystavených otvoreným formám tuberkulózy), u pacientov pred začatím biologickej liečby preparátmi antiTNF α , ďalej pri vyšetrení rizikových skupín (utečenci, vojaci pôsobiaci na misiách v krajinách s vysokou prevalenciou tuberkulózy, väzni).

5.1.1 Kožný tuberkulínový test

Tuberkulínový test (Mantoux II) je celosvetovo akceptovaný spôsob diagnostikovania latentnej formy tuberkulózneho infekcie.

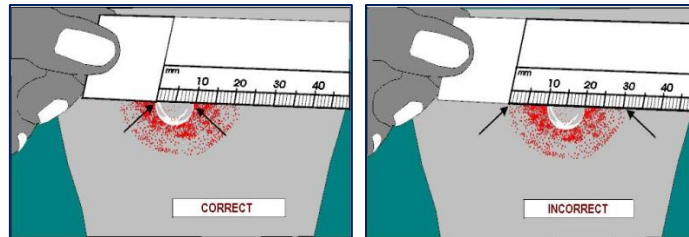
Princíp: Ide o precitlivosť tuberkulínového typu, ktorá patrí k **IV. typu hypersenzitivity (oneskorená, sprostredkovaná bunkami)**. Robert Koch popísal túto formu precitlivenosti u chorých na tuberkulózu. Po subkutánnej injekcii tuberkulínu mali pacienti celkový pocit choroby so zvýšenou teplotou a na mieste injekcie vznikol edém a zatvrdnutie kože. Práve táto kožná reakcia sa dnes využíva v tuberkulínovom kožnom teste. T-lymfocyty po kontakte s antigénom mikroorganizmu (prezentovaným antigén prezentujúcimi bunkami) uvoľňujú do prostredia početné cytokíny typu Th1 (hlavne interferón gama – IFN γ , interleukín 2), ktoré vyvolávajú zmeny typické pre tieto reakcie. Priťahujú makrofágy do miesta aplikácie tuberkulínu, kde dochádza k nahromadeniu makrofágov a ich aktivácii. Zatvrdnutie, edém a erytém majú najväčšiu intenzitu za 48-72 hodín, preto „oneskorený“ typ hypersenzitivity (obrázok 69).



Obr. 69 Princíp tuberkulínovej reakcie (upravené podľa: *elsevierimages.com*)

Postup: Pri kožnom tuberkulínovom teste sa aplikuje injekčne 0,1 ml (5 tuberkulínových jednotiek) purifikovaného proteínového derivátu – PPD do hornej vrstvy pokožky predlaktia bez abnormalít. Aplikuje sa prísne intradermálne. Správna aplikácia vedie k diskretnému bledému vyvýšeniu kože v mieste aplikácie 6-10 mm v priemere, ktorý sa rýchlo vstrebáva.

Odčítanie: Kožný test sa odčíta za 48-72 hodín od aplikácie tuberkulínu. Reakcia na tuberkulín je prítomnosť hmatnej, vyvýšenej svrdnutej plochy v okolí miesta vpichu, tzv. indurácia. Hodnotí sa prítomnosť a priemer indurácie. Priemer sa meria priečne k dlhej osi predlaktia (obrázok 70, 71). Začervenanie, prípadne podliatina sa nemerajú. Miesto aplikácie môže svrbieť, môžu vzniknúť aj pľuzgieriky naplnené tekutinou alebo iné narušenie celistvosti kože v mieste vpichu. Po viac ako 72 hodinách je výsledok už skreslený.



Obr. 70 Odčítanie kožného testu (vľavo správne, vpravo nesprávne meranie)
(<http://www.jfmed.uniba.sk>)



Obr. 71 Postup pri odčítaní kožného testu (meranie priemeru indurácie kolmo k dlhej osi predlaktia) (http://images.slideplayer.cz/10/2641126/slides/slide_23.jpg)

Interpretácia tuberkulínového testu

Interpretácia tuberkulínového testu je komplikovaná postvákcináčnou imunitou (po BCG vakcíne). Špecificita a senzitivita vyšetrenia je vzhľadom k postvákcináčnej imunitě nízka. Špecificita (pravdepodobnosť, že test bude negatívny u osôb bez choroby) je u BCG vakcinovanej populácie 46-73 %. Senzitivita (pravdepodobnosť, že test bude pozitívny u chorých) u BCG vakcinovanej populácie je 77 % (Pai a spol., 2010).

Falošne pozitívne výsledky tuberkulínového testu môžu vzniknúť nielen po BCG vakcinácii, ale aj pri infekciách atypickými baktériami, pri aplikácii tuberkulínu do miesta patologicky zmenenej kože, atď.

Falošne negatívny výsledok tuberkulínového testu môže vzniknúť po prekonanej vírusovej infekcii, očkovaní živou vírusovou vakcínou, po imunosupresívnej/kortikosteroidnej liečbe, u pacientov s HIV, atď.

Priemer indurácie je interpretovaný ako pozitívny v závislosti od určitých okolností:

- Zdravý imunitný systém – 15 a viac mm
- Oslabený imunitný systém – 5 a viac mm
- Zdravotníci pracovníci, kontakty s aktívnou tuberkulózou, bezdomovci, väzni, utečenci, - 10 a viac mm

5.1.2 IGRA testy (Interferón Gamma Release Assay)

Sú imunologické testy *in vitro* medzinárodne schválené na detekciu latentnej tuberkulóznei infekcie. Používa sa QuantiFERON – TB Gold test alebo T-SPOT.TB test. Tieto testy pomáhajú detegovať infekciu *M. tuberculosis*.

Princíp: Založené sú na kvantifikácii interferónu gama (INF- γ) uvoľneného zo senzibilizovaných T-lymfocytov v plazme ako reakcia na antigény *M. tuberculosis* pomocou ELISA testu (4.2.1) alebo ELISPOTu (kapitola 4.4). Majú menej falošne pozitívnych výsledkov ako kožný tuberkulínový test.

Indikácie: IGRA testy sú indikované podľa metodického odporúčania hlavného odborníka MZ SR pre odbor pneumológie a ftizeológie:

- U všetkých pacientov pred začatím biologickej liečby preparátmi antiTNF α : každý pacient pred začatím takejto liečby musí byť vyšetrený pneumológom a dispenzarizovaný za účelom vylúčenia latentnej alebo aktívnej tuberkulóznei infekcie. Ide o preparáty používané pri liečbe reumatoidnej artritídy, juvenilnej chronickej artritídy, ankylozujúcej spondylitídy, psoriázy, psoriatickej artritídy, ulceróznei kolitídy a Crohnovej choroby. TNF α plní kľúčovú úlohu v obranyschopnosti proti mykobakteriálnym infekciám a pri oslabení jeho aktivity hrozí riziko reaktívacie tuberkulózy alebo infekčných ochorení vyvolávajúcich granulomatózne reakcie.
- U zdravotníckych pracovníkov, ktorí sú v kontakte s otvorenými formami tuberkulózy
- U vojakov prichádzajúcich z misií z krajín s vysokou prevalenciou tuberkulózy
- U rizikových skupín pri podozrení na výskyt tuberkulózy (žijúcich v oblastiach s vysokou prevalenciou tuberkulózy)
- V rámci diferenciálnej diagnostiky pri pľúcnej a mimopľúcnej tuberkulóze
- Opakovane raz za rok u pacientov liečených preparátmi antiTNF α
- U kontaktov, osôb, ktoré boli v styku s pacientom s aktívnou formou tuberkulózy.

QuantiFERON – TB Gold test

Je to imunologický diagnostický laboratórny test, ktorý napomáha detegovať infekciu *M. tuberculosis*.

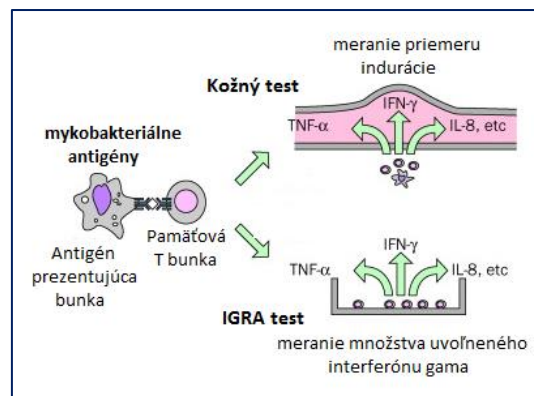
Postup: Test zahŕňa odber krvi venepunkciou do 3 špeciálnych skúmaviek s farebne označenými vrchnákmi (sivý – Nill Control, červený – TB antigén, modrofialový – Mitogen Control) v množstve 1 ml krvi do každej skúmavky – po čiernej rýse na skúmavke, následné dôkladné premiešanie. V laboratóriu nasleduje inkubácia heparinizovanej krvi 16-24 hodín s antigénmi, ktoré sa vyskytujú iba v *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10, TB7.7) a nie sú prítomné v žiadnom z kmeňov používaných pri BCG vakcinácii. Práve chýbanie týchto antigénov v BCG vakcíne sa využíva v diagnostike aktívnej aj latentnej tuberkulóznei infekcie v populácii očkovanej BCG vakcínou. Špecifita testu je odhadovaná na 98 %, senzitivita testu na 89 %. Po inkubácii nasleduje stanovenie INF- γ v plazme pomocou ELISA testu. Výhody QuantiFERON – TB Gold testu spočívajú v tom, že výsledok nie je ovplyvnený predchádzajúcou BCG vakcináciou, nevzniká subjektívna chyba pri odčítaní

výsledku a stačí jedna návšteva u lekára, netreba sa dostaviť na odčítanie testu v presnom termíne.

Výsledok: Pozitívny výsledok vyšetrenia IGRA testom podporuje diagnózu infekcie *M. tuberculosis*. Je nutné korelovať s klinickými nálezmi a anamnestickými údajmi a usilovať sa o bakteriologické potvrdenie štandardnými metódami (mikroskopia, klasické a metabolické kultivačné metódy a génové metódy).

Negatívny výsledok vyšetrenia znamená, že aktívna infekcia *M. tuberculosis* je nepravdepodobná, ale nemožno ju s určitosťou vylúčiť. Doporučuje sa klinické sledovanie s eventuálnym vykonaním štandardných bakteriologických vyšetrení a v časovom odstupe je možné IGRA test opakovať.

Obidva typy testov vykonávaných *in vivo* (kožný test) aj *in vitro* (IGRA testy) sú schematicky znázornené na obrázku 72.



Obr. 72 Testy *in vivo* a *in vitro* na detekciu aktívnej alebo latentnej tuberkulózne infekcie (upravené podľa: <http://www.thelancet.com/cms/attachment/2002735434/2009762277/gr1.jpg>)

Referencie:

Neuschlová M, Nováková E, Kompaníková J. Návody na praktické cvičenia z imunológie. JLF UK Martin, 2016, str.84-88. ISBN 978-80-8187-017-0.