

## Uusi immunologian tutkimus: *Mycobacterium tuberculosis* -herkistyneet lymfosyytit, gammainterferoni, ELISPOT

<b>Tutkimus</b>	20187	Ly-TbSpot	Ly-Mycobacterium tuberculosis -herkistyneet lymfosyytit, gammainterferoni, ELISPOT
<b>Asia</b>	Uusi tutkimus 15.2.2007 lähtien		
<b>Johdanto</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb)-antigeenia tunnistavia veren T-lymfosyyttejä osoitetaan mittaamalla spesifisillä peptidiantigeeneilla stimuloitujen T-lymfosyyttien interferoni gamma (IFN $\gamma$ ) - tuotantoa ELISPOT menetelmällä. Positiivinen tulos osoittaa elimistössä elinkykyisenä olevaa bakteeria.		
<b>Perustelut</b>	Suomalaisessa perusväestössä tuberkuloosi (TB) on nykyään harvinainen tauti. Maahanmuuttajilla ja riskiryhmillä TB voi olla yllättävä ja epätyypillinen. Keuhkojen ulkopuolinen (ekstrapulmonaalinen) TB voi olla vaikea diagnosoida, koska infektio paikalta ei saada näytettä tai perinteisillä viljely- ja geenimonistusmenetelmillä saattaa olla riittämätön herkkyys. Latentin tuberkuloosi-infektion (LTBI) diagnostiikka on tähän mennessä perustunut <i>Mantoux</i> reaktioon, joka Suomessa lähes 100% kattavan BCG rokotuksen ansiosta usein johtaa väärin positiivisiin tuloksiin. Silti <i>Mantoux</i> -reaktio voi olla joidenkin henkilöiden kohdalla myös epäherkkä. Tässä tutkimuksessa BCG-rokotus ei johda positiiviseen tulokseen. Biologisia lääkkeitä saavasta potilasryhmästä eräät voivat olla riskissä kokea TB-taudin aktivoitumisen, mikäli heillä on LTBI. Ly-TbSpot -tutkimus soveltuu LTBI ja muun aktiivin TB taudin diagnostiikkaan värjäyksen, viljelyn ja geenimonistusmenetelmien rinnalla.		
<b>Asiantuntijat</b>	lääkäri Ilkka Seppälä: <a href="mailto:ilkka.seppala@hus.fi">ilkka.seppala@hus.fi</a> (09) 191 26394 / 040 838 4011, lääkäri Tamara Tuuminen: <a href="mailto:tamara.tuuminen@hus.fi">tamara.tuuminen@hus.fi</a> 050 427 1044, lääkäri Aaro Miettinen: <a href="mailto:aaro.miettinen@hus.fi">aaro.miettinen@hus.fi</a> (09) 191 26371, 050 427 2035		
<b>Tiedustelut</b>	Immunologian osasto, puh. (09) 191 26291 tai 050 427 9283		
<b>Lähetä</b>	Immunologiset tutkimukset.		
<b>Indikaatiot</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Mtb)-infektion tunnistus.		

Mtb:n aiheuttamat kliiniset ja subkliiniset infektiot, erityisesti vaikeasti diagnosoitavat ekstrapulmonaaliset muodot (luustopesäkkeet, lymfadeniitti, sekä latentin tuberkuloosi-infektion diagnostiikka), ja varotoimenä ennen infektoriskiä lisäävän hoidon aloitusta. Menetelmä soveltuu myös lapsipotilaille. Menetelmää voidaan käyttää epäselvissä differentiaalidiagnostiikkaa vaativissa tilanteissa, kuten esim. vaskuliiteissa ja hematologisen maligniteetin epäilyssä. Tutkimusta voidaan käyttää myös hoidon seurannassa, sillä hoidossa olevilla TB-potilailla reaktiivisten solujen määrä laskee jo 3 kk kuluttua hoidon aloituksesta.

HUOM! Haponkestävän sauvan värjäys ja viljely ovat edelleen ensisijaisia menetelmiä kliinisten TB infektioiden tunnistuksessa.

<b>Näyteastia</b>	CPT/Na-sitraatti -putki	
<b>Näytteenotto- määrä</b>	Aikuiset ja lapset yli 20 kg:	8 ml
	Lapset alle 20 kg:	4 ml
<b>Näytteenotto- ohjeet</b>	Vanhentunutta putkea ei saa käyttää.	
	Veriputki sekoitetaan näytteenoton jälkeen, mutta sen jälkeen se tulee säilyttää ja kuljettaa pystyasennossa. Putki pidetään sekä ennen näytteenottoa että sen jälkeen huoneenlämmössä. Jos putkimallia (CPT 8 ml koodi 362782, tai CPT 4 ml koodi 362781, Becton Dickinson) ei käytetä näytteenottopisteessä jatkuvasti, voi putken tilata Immunologian osaston näytteiden vastaanotosta puh (09) 191 26291.	

#### **Näytteen säilytys ja lähetys:**

Tutkimus suoritetaan **keskiviikkoisin**. Näyte otetaan tutkimuspäivänä ja se on kuljetettava Immunologian laboratorioon 4 tunnin kuluessa ja sen on oltava laboratoriossa klo 13.00 mennessä. Kiireellisissä tapauksissa tai jos toimitus viivästyy, pyydetään ottamaan yhteyttä Immunologian osastoon, GSM 050 4279283, tarkempia neuvoja varten. Kuljetuksessa suosittelemme käyttämään yhdeksän putken Styrox- kuljetuslaatikkoa (esim. Mekalasi OY koodi 22561). Laatikko pakataan Minigrip pussiin (esim. koodi A8F0100030).

Näytteet on lähetettävä siten, että ne säilyvät kuljetuksen aikana **huoneenlämpöisenä (n. +18 ... +22 °C)**.

**Menetelmä** Ly-TbSpot on immunologinen tutkimusmenetelmä, jolla osoitetaan potilaan verestä *M. tuberculosis* antigeeneille herkistyneitä T-lymfosyttejä. Eristettyjä mononukleaarisia valkosoluja stimuloidaan *M. tuberculosis*-bakteerille spesifisillä peptideillä 24 tuntia. Jos näytteessä on näille peptideille herkistyneitä "efektori"-T-lymfosyyttejä, ne aktivoituvat ja tuottavat interferoni gammaa (IFN $\gamma$ ). Eritetty IFN $\gamma$  osoitetaan monoklonalisilla vasta-aineilla, joista toinen on kiinnitetty mikrotitterilevyn membraaniin ja toinen, entsyymillä leimattu, reagoi substraatin kanssa muodostaen värillisiä täpliä (spotteja). Reaktiivisten solujen määrä lasketaan.

**Tekotiheys** Kerran viikossa, keskiviikkoisin.

**Tulokset valmiina** Alustava kvalitatiivinen tulos on valmiina seuraavana työpäivänä. Kvantitatiivinen tulos on valmiina 6 työpäivän kuluessa.

**Tulkinta** Viitearvot:

Reaktiivinen	> 55 spot/E6 lymfos.
Raja-arvoinen	25-55 spot/E6 lymfos.
Nonreaktiivinen	< 25 spot/E6 lymfos.

Tulokset ilmoitetaan reaktiivisten lymfosyyttien määränä /E6 perifeerisen veren lymfosyyttiä, kullekin antigeenille erikseen. Antigeeni A on ESAT- 6 peptidiseos, Antigeeni B on CFP-10 peptidiseos ja kontrolliantigeeni on PPD (*M. tuberculosis* "Purified Protein Derivative" -proteiiniseos, jonka antigeenien pääosa on läsnä myös BCG-rokotekannalla). Spesifisten antigeenien antama positiivinen tulos viittaa elinkykyisen *M. tuberculosis* -bakteerin läsnäoloon elimistössä. Positiivinen PPD-tulos voi seurata *M. tuberculosis*-kontaktista tai BCG-rokotuksesta. PPD-antigeenin negatiivinen tulos osoittaa joko rokottamattomuutta tai heikkoa reaktiota *M. tuberculosis* -antigeeneille. Heikko reaktio voidaan havaita myös vaikeassa tuberkuloosissa tai muussa immunosuppressiotilassa, jolloin myös spesifisten peptidiantigeenien antama tulos voi jäädä negatiiviseksi.

Harvinaiset *M. marinum*, *M. kansasii* ja *M. szulgai* -infektiot voivat myös antaa positiivisen tuloksen spesifisillä peptideillä. Tulokseen liittyy lausunto.

Negatiivinen tulos ei sulje pois infektion mahdollisuutta vahvasti immunosuprimoiduilla potilailla ja erittäin vaikeassa TB-taudissa.

Lymfopeniapotilailla tämä tutkimus on suositeltavampi kuin B-TbIFNg tutkimus. Lymfopenisten näytteiden tulkinta on silti epävarmaa.

Saadut tulokset ja niiden kliininen merkitys arvioidaan yhteistyössä lähettävän yksikön kanssa. Toistaiseksi menetelmän validointi on suppeaa.

**Huomautuksia** Tämä on erikoistutkimus, josta annetaan lausunto. Tutkimusta pyydettyessä tulee ilmoittaa pyynnön aihe.

Tutkimuksessa tarvitaan eläviä lymfosyyttejä. Lämpötilan noustessa tai alittaessa huonelämpötilan näytteiden kelpoisuus tutkimukseen heikkenee merkittävästi.

**Menetelmän spesifikaatiot:** Menetelmä on validoitu 69:llä prospektiivisesti kerätyllä näytteellä, joista 24 oli peräisin aikuis- ja 29 lapsipotilailta. Viidestä henkilöstä on tutkittu seurantanäytteitä. Tällä aineistolla saatiin arvioina:

Kliininen spesifisyys	100 %
Kliininen herkkyys	81 %
Positiivinen ennustearvo (PPV)	100 %
Negatiivinen ennustearvo (NPV)	88 %
Todenperäisyys (Accuracy)	92 %

**Allekirjoitukset**

Ilkka Seppälä dosentti, osastonylilääkäri Immunologian osasto puh. 040 838 4011	Aaro Miettinen dosentti, osastonylilääkäri Immunologian osasto puh. 050 427 2035	Martti Vaara Prof. ,vastaava ylilääkäri, vastuualuejohtaja Kliinisen mikrobiologian vastuualue puh. (09) 471 75822
--	---	---

**Jakelu**

Laboratoriojakelu  
HUS-piirin sairaaloiden laboratoriot  
Helsingin terveysasemien ylilääkärit  
Helsingin ja Vantaan perusterveydenhuollon ylilääkärit  
Peijaksen sairaalan lääkärit  
Jorvin sairaalan ylilääkärit  
Jorvin sairaalan osastot  
Porvoon ylilääkärit  
HUSLABin intranet-sivut  
HUSLABin Internet-sivut  
Ulkopuoliset asiakkaat  
HUS:n kliiniset toimialat