ارزیابی تست گاما اینترفرون خون در تشخیص عفونت نهفته توبرکولوزیس به عنوان جایگزینی بالقوه برای تست پوستی مانتو

امینا کریمی نیا[۱]، زرین شریف نیا[۲]، آرزو آقاخانی[۳]، محمد بنی فضل[۴]، علی اسلامی فر[۳]، زهرا دلجودخت[۵]، محبوب حضرتی[۶] و آمیتیس رمضانی[۷*]

۱. PhD ایمونولوژی ، استادیار انستیتو پاستور ایران
۲. فوق لیسانس ایمونولوژی ، دانشگاه علوم پزشکی شاهد
۳. پاتولوژیست، استادیار انستیتو پاستور ایران
۴. انجمن حمایت از بیماران عفونی کشور
۵. کارشناس آزمایشگاه، انستیتو پاستور ایران
۶. پزشک عمومی ، بخش واکسیناسیون انستیتو پاستور ایران
۷. متخصص بیماریهای عفونی و گرمسیری، استادیار انستیتو پاستور ایران

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران ، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، تلفن: ۶۶۹۶۸۸۵۲ ، iiccom@iiccom.com

دریافت مقاله: تیرماه هشتاد و شش **پذیرش برای چاپ: مهر ماه هشتاد و شش**

چکیده

سابقه و هدف: *گرچه تست پوستی توبرکولین(PPD) در بررسی های بالینی برای تشخیص عفونت نهفته سلی(LTBI) مفید می باشد ولی دارای محدودیت هایی است. انتظار می رود تست جدید QuantiFERON-TB Gold In-Tube test (QFT) نسبت به PPD برای تشخیص LTBI اختصاصی تر باشد. هدف از این مطالعه مقایسه QFT با PPD در تشخیص LTBI می باشد.*

روش کار: *در این مطالعه ۱۸۶ نفر که برای ازمون استخدامی به انستیتو پاستور ایران ارجاع شده بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. تمام این افراد واکسن BCG دریافت کرده بودند. ازمایشات PPD و QFT بر روی انها انجام شد. این افراد به ۲ دسته شامل افراد با خطر بالا و پایین آلودگی به سل تقسیم شدند. PPD مثبت با سفتی مساوی یا بیش از ۱۰ میلی متر تعریف شد.*

یافته ها: *Agreement بین PPD و QFT ۸۹/۳٪ بود(کاپا=۰/۰۵۲). Agreement بین PPD و QFT در LRG ۵۲/۶٪ (کاپا=۰/۰۱۹) و در HRG ۶۳/۲٪(کاپا= ۰/۲۸)بود. حساسیت و ویژگی QFT در مقایسه با PPD در LRG به ترتیب ۸٪ و ۹۳/۸٪ و در HRG ۳۰٪ و ۱۰۰٪ بود.*

نتیجه گیری: *مطالعه ما نشان داد که QFT نسبت به PPD روش اختصاصی تری برای تشخیص LTBI به ویژه در HRG می باشد.*

واژگان کلیدی : ***QuantiFERON-TB Gold In-Tube test (QFT), PPD, Latent Tuberculosis infection (LTBI)***

مقدمه

سازمان بهداشت جهانی (WHO) براورد کرده است که تقریبا ۳۳٪ جمعیت جهان با مایکوباکتریوم توبرکولوزیس (M.TB) آلوده می باشند(۱،۲). این مخزن بزرگ عفونت نهفته مانع بزرگی برای کنترل سل در جهان می باشد. سالانه بین ۸ تا ۹ میلیون نفر مبتلا به سل شده و ۲ میلیون نفر از سل می میرند(۱،۳،۴).امروزه از PPD برای تعیین عفونت نهفته سلی (LTBI)استفاده می شود(۵). گرچه PPD به فراوانی در جهان استفاده می گردد ولی به عنوان استاندارد طلائی قابل اطمینان نمی باشد زیرا منفی و مثبت کاذب زیادی در تفسیر ان وجود دارد(۶). همچنین لزوم بازگشت افراد جهت تفسیر تست مشکلات متعددی را در استفاده از PPD ایجاد کرده است(۷). از سوی دیگر نتایج PPD در افراد واکسینه باBCG یا در تماس با مایکوباکتریومهای محیطی سبب ایجاد واکنشهای متقاطع(مثبت کاذب) می گردد(۵). اخیرا روش تشخیصی جدیدی که بسیار اختصاصی تر از PPD بوده و با واکسیناسیون BCG قبلی افراد تداخلی ندارد مورد استفاده قرار گرفته است(۵).تست QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT) سیستم ایمنی سلولی را به صورت invitro با اندازه گیری گاما انترفرون در خونی که با آنتی ژنهای M.TB (ESAT-6 ، CFP-10 و Rv2654) انکوبه شده است می سنجد. سپس الیزا ، گاما انترفرون تولید شده توسط سلولهای T را اندازه گیری می کند(۶).هدف از این مطالعه مقایسه QFT با PPD در تشخیص LTBI در دو گروه افراد با ریسک پایین الودگی به سل (LRG) و ریسک بالای الودگی به سل(HRG)می باشد. تمام این افراد واکسن BCG دریافت کرده بودند.

روش کار

در این مطالعه ۱۸۶ نفر که برای ازمون استخدامی به انستیتو پاستور ایران ارجاع شده بودند و همگی بالاتر از ۱۸ سال بودند مورد مطالعه قرار گرفتند. هیچیک از آنها باردار نبوده و مبتلا به بیماریهای نقص ایمنی نیز نبودند. ۱۵۶ نفر از آنها مذکر (۸۳/۸۷٪) و ۳۰ نفر مونث(۱۶/۱۳٪) با میانگین سنی ۹/۱۰ ± ۲۸/۴۰ سال (۱۷ تا ۶۸ سال) بودند. بر اساس پرسشنامه و سابقه پزشکی افراد ، مراجعه کنندگان به دو دسته افراد با خطر پایین (LRG) و بالا (HRG) آلودگی به سل تقسیم شدند.گروه LRG شامل افرادی بودند که عامل خطر شناخته شده ای برای الودگی با مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مانند تماس قبلی با مورد شناخته شده بیماری (index case) یا سابقه بیماری سل را نداشتند و گروه HRG شامل افرادی بودند که یکی از عوامل خطر فوق را داشتند. تمام این افراد واکسن BCG دریافت کرده بودند.از هر بیمار ۳ سی سی خون هپارینیزه جهت QFT گرفته شد.PPD به صورت داخل جلدی تزریق شد و ۷۲ ساعت بعد نتیجه آن قرائت گردید. PPD مثبت به صورت سفتی مساوی یا بیش از۱۰ میلی متر تعریف شد*آزمایش* QFT-TB: پاسخ گاما انترفرون به آنتی ژنهایESAT-6 ، CFP-10 و Rv2654 بر اساس دستورالعمل سازنده (Cellestis Limited, Victoria, Australia) توسط QFT اندازه گیری شد. این ارزیابی شامل دو مرحله بود :۱- انکوباسیون خون کامل با آنتی ژنها ۲- اندازه گیری تولید گاما انترفرون در پلاسما توسط الیزا.

ابتدا خون وریدی به سه لوله ۱ سی سی هپارینیزه منتقل گردید. یکی از لوله ها به عنوان کنترل منفی تنها حاوی هپارین بود و دیگری به عنوان کنترل مثبت حاوی فیتو هماگلوتینین، میتوژن T cell و سومین لوله حاوی پپتید های نمایانگر آنتی ژنهایESAT-6 ، CFP-10 و Rv2654 بود. در عرض یکساعت پس از خونگیری لوله ها در ۳۷ درجه انکوبه شدند. بعد از ۲۰ ساعت از انکوباسیون لوله ها سانتریفوژ شده و محصول پلاسما در ۲۰- درجه تا زمان انجام الیزا فریز گردید. میزان گاما انترفرون با الیزا اندازه گیری شد.سپس با نرم افزار QFT ،نتایج الیزا خوانده شد.یافته ها با استفاده از نرم افزار SPSS 11.5 تجزیه و تحلیل شدند و مرز معنی داری اختلافات روی $P<0.05$ قرار داده شد. داده ها به صورتmeans ± standard deviations و در صورت لزوم عدد مطلق یا در صد گزارش شدند. agreement بین QFT و PPD با استفاده از ضریب همبستگی کاپا اندازه گیری شد. مقادیر کاپای کمتر از ۰/۴ همبستگی ضعیف ، ۰/۴۱ تا ۰/۶ همبستگی خوب و مقادیر کاپای بالاتر از ۰/۶ همبستگی قوی را نشان می دهد(۱۴).

یافته ها

هر دو تست QFT و PPD برای ۱۸۶ نفر انجام شد. ۱۴ نفر (۱۰ مرد و ۴ زن ، ۷/۵٪)QFT مثبت و ۱۷۲ نفر (۹۲/۵٪) QFT منفی داشتند. ولی جنسیت ارتباط معنی داری با QFT مثبت نشان نداد. ۱۷۶ نفر از ۱۸۶ فرد جهت تفسیر PPD مراجعه کردند. ۸۵ نفر (۴۸/۳٪)PPD مثبت و ۹۱ نفر (۵۱/۷٪)PPD منفی بودند.میانگین PPD ۷/۵ ± ۹/۷ میلی متر (حداقل صفر و حداکثر ۳۶ میلی متر)بود. ۸۶ نفر (۴۸/۸۶٪) با هر دو تست منفی بوده و ۹ نفر (۵/۱۲٪) با هر دو تست مثبت بودند.۵ نفر (۲/۸۴٪) QFT مثبت و PPD منفی و ۷۶ نفر (۴۳/۱۸٪) QFT منفی و PPD مثبت داشتند. agreement، حساسیت و ویژگی QFT در مقایسه باPPD به ترتیب ۸۹/۳٪ (کاپا ۰/۰۵۲) ، ۱۰/۶٪ و ۹۴/۵٪ بود.

۸۹/۲۴٪ از افراد LRG و ۱۰/۷۶٪HRG بودند. در LRG ۴۸/۷۱٪ افراد با هر دو تست منفی بوده و ۳/۸۵٪ افراد با هر دو تست مثبت بودند.۳/۲۱٪ QFT مثبت و PPD منفی و ۴۴/۲۳٪ QFT منفی و PPD مثبت داشتند. agreement، حساسیت و ویژگی QFT در مقایسه باPPD به ترتیب ۵۲/۶٪ (کاپا ۰/۰۱۹) ،۸٪ و ۹۳/۸٪ بود.

در HRG ۵۰٪ افراد با هر دو تست منفی بوده و۱۵٪ آنان با هر دو تست مثبت بودند. ۳۵٪ QFTمنفی و PPD مثبت داشتند و هیچ یک از آنان QFT مثبت و PPD منفی نداشتند. agreement، حساسیت و ویژگی QFT در مقایسه باPPD به ترتیب ۶۳/۲٪ (کاپا ۰/۲۸) ،۳۰٪ و ۱۰۰٪ بود.

بحث

توبرکولوزیس از مشکلات بهداشتی عمده می باشد. تخمین زده می شود تقریبا ۳۳٪ جمعیت کره زمین به مایکوباکتریوم توبرکولوزیس الوده بوده و اغلب انها از یک فرم نهفته عفونت رنج می برند(۶). یکی از مشکلات کنترل سل محدودیت تست های تشخیصی کنونی می باشد(۱۵). به ویژه در مناطق تروپیکال که پوشش واکسیناسیون ب ث ژ بالا می باشد(۱۶). تاکنون تست پوستی توبرکولین(PPD) تنها روش تشخیص عفونت نهفته سلی(LTBI) بوده است. گرچه این تست در بررسی های بالینی مفید می باشد ولی دارای محدودیت هایی مانند ویژگی متغیر و واکنشهای متقاطع با واکسن و مایکوباکتریوم های غیر توبرکولوزیس است(۱۷،۱۸). نشان داده شده است که ازمایشات اینترفرون گاما با استفاده از انتی ژنهایESAT-6 ، CFP-10 و Rv2654 به مراتب اختصاصی تر ازPPD می باشد(۱۹). به علاوه این ازمایشات از سایر جوانب مانند تنها یک بار نیاز به مراجعه و امکان خواندن نتیجه در عرض ۲۴ ساعت نیز نسبت بهPPD ارجح می باشد(۱۹).QFT در چندین کشور از جمله هند، کره ،ایتالیا، دانمارک، هلند و ژاپن بررسی شده است(۵،۱۱،۱۲،۲۲-۲۰).

Mazurek و همکارانش گزارش کردند که در افراد مبتلا به LTBI که غربالگری می شوند، QFT کمتر ازPPD تحت تاثیر واکسیناسیون قبلی قرار می گیرد(۲۳).

Taggart نشان داد که QFT در ۴۱/۴٪ از افراد سالم واکسینه با BCG مثبت بوده است.در این بررسی آزمون QFT در گروه با خطر پایین agreement۹۶/۸٪ ،حساسیت ۵۰٪ ، و ویژگی ۹۸/۴٪ در مقایسه با PPD داشت(۶). مطالعه ای از دانمارک گزارش نمود که QFT حساسیت ۷۳٪ ، و ویژگی ۹۳٪ در مقایسه با PPD دارد(۲۲). Mori حساسیت ۸۹٪ را در بیماران مبتلا به توبرکلوزیس و ویژگی ۹۸٪ را در افرادLRG واکسینه با BCG گزارش کرد(۱۱).

در مطالعه ما agreement QFT در مقایسه باPPD ۸۹/۳٪ (کاپا ۰/۰۵۲) بود. این agreement با کاپای پائین با یافته های دیگر مطالعات تطبیق می کند که agreement بین ۸۱/۴٪ تا ۹۵٪ را ذکر کرده اند(۴،۱۰،۱۲،۲۱).

چندین مطالعه discordance بین نتایج PPD و QFT را به خصوص در نوع PPD مثبت، QFT منفی نشان داده اند(۲۱،۲۴).بررسی اخیر در آفریقای جنوبی گزارش کرد که در بین افراد با واکنش بیشتر از ۱۵ میلی متر PPD، ۳۳٪ QFT منفی دارند(۲۵).در مطالعه ای دیگر از هند مشاهده شد که در ۱۱٪ افراد PPD مثبت (حداقل ۱۵ میلی متر)، QFT منفی می باشد(۱۰).

در مطالعه ما ۴۳/۱۸٪ از افراد PPD مثبت و QFT منفی بودند. این discordance می تواند به علت مثبت کاذب PPD باشد. در نواحی دارای بروز بالای توبرکولوزیس فاکتورهای متعددی که بر روی بالانس T helper 1 , 2 نقش دارند مانند سوء جذب، واکسیناسیون BCG و عفونتهای انگلی و حاره ای میتوانند در تنظیم پاسخ ایمنی موثر باشد(۲۶). مطالعه ما نشان داد که تست QFT دارای ویژگی بالا برای تعیین عفونت با M.TB در دو گروه LRG و به خصوص HRG می باشد و بر بسیاری از محدودیتهای PPD غلبه می کند.ویژگی بالای QFT افتراق عفونت واقعی توبرکولوز را از واکنشهای متقاطع میسر می سازد.مطالعات وسیعتری برای مقایسه QFT با PPD در بیماران LTBI توصیه می شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از انستیتو پاستور ایران به جهت حمایت مالی طرح فوق قدردانی می نمایند.

REFERENCES

1. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. Arch Intern Med. 2003; 163:1009–1021.

2. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA. 1999; 282:677–686.

3. World Health Organization. Global tuberculosis control. Surveillance, planning, financing. WHO Report. Geneva, 2005; 1–247.

4. Pai M, Joshi R, Dogra S, et al. Persistently elevated T cell interferon-gamma responses after treatment for latent tuberculosis infection among health care workers in India: a preliminary report. J Occup Med Toxicol. 2006; 23:1-7.

5. Arend SM, Engelhard AC, Groot G, Andersen P, Ottenhoff TH, van Dissel JT. Tuberculin skin testing compared with T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact. Clin Diagn Lab Immunol. 2001; 8(6):1089-96.

6. Taggart EW, Hill HR, Ruegner RG, Martins TB, Litwin CM. Evaluation of an in vitro assay for gamma interferon production in response to Mycobacterium tuberculosis infections. Clin Diagn Lab Immunol. 2004; 11(6):1089-93.

7. Desem N, Jones SL. Development of a human gamma interferon enzyme immunoassay and comparison with tuberculin skin testing for detection of Mycobacterium tuberculosis infection. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998; 5:531-536.

8. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty, TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet 2000; 356:1099-104.

9. Mazurek GH, Jereb J, LoBue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A. Guidelines for Using the QuantiFERON®-TB Gold Test for Detecting Mycobacterium tuberculosis Infection, United States. MMWR 2005; 54: 49-55.

10. Pai M, Gokhale K, Joshi R, et al. Mycobacterium tuberculosis infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood, interferon-g assay with tuberculin skin testing. JAMA. 2005; 293:2746–2755.

11. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. Am J Respir Crit Care Med. 2004; 170:59–64.

12. Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, Follmann F, Andersen P. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. Am J Respir Crit Care Med. 2004; 170:65–69.

13. Dogra S, Narang P, Mendiratta DK, et al. Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. J Infect. 2007; 54(3):267-76.

14. Sachs L, Statistik A. Anwendung statistischer Methoden. 10. Berlin, Springer; 2002.

15. Floyd S, Pönnoghaus JM, Bliss L, et al. Kinetics of delayed-type hypersensitivity to tuberculin induced by bacille Calmette-Guérin vaccination in Northern Malawi. J Infect Dis 2002; 186:807–14.

16. Hill PC, Brookes RH, Fox A ,et al. Large-scale evaluation of enzyme-linked immunospot assay and skin test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection against a gradient of exposure in The Gambia. Clin Infect Dis. 2004; 38(7):966-73.

17. Huebner RE, Schein MF, Bass JBJ. The tuberculin skin test. Clin Infect Dis. 1993; 17:968–975.

18. Menzies D. What does tuberculin reactivity after bacille Calmette-Guerin vaccination tell us? Clin Infect Dis. 2000; 31: 71–4.

19. Porsa E, Cheng L, Seale MM, et al. Comparison of a new ESAT-6/CFP-10 peptide-based gamma interferon assay and a tuberculin skin test for tuberculosis screening in a moderate-risk population. Clin Vaccine Immunol. 2006 Jan; 13(1):53-8.

20. Ferrara G, Losi M, Meacci M, et al. Routine hospital use of a commercial whole blood interferon-gamma assay for tuberculosis infection. Am J Respir Crit Care Med. 2005; 172(5):631-5.

21. Kang YA, Lee HW, Yoon HI, et al. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. JAMA. 2005; 293(22):2756-61.

22. van Pinxteren LA, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP-10. Clin Diagn Lab Immunol. 2000; 7(2):155-60.

23. Mazurek GH, LoBue PA, Daley CL, et al. Comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing for detecting latent Mycobacterium tuberculosis infection. JAMA. 2001; 286(14):1740-7.

24. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in a school tuberculosis outbreak. Lancet. 2003 ; 361(9364):1168-73.

25. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. Lancet. 2001; 357(9273):2017-21.

26. Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part I. Latent tuberculosis. Expert Rev Mol Diagn. 2006; 6(3):413-22.