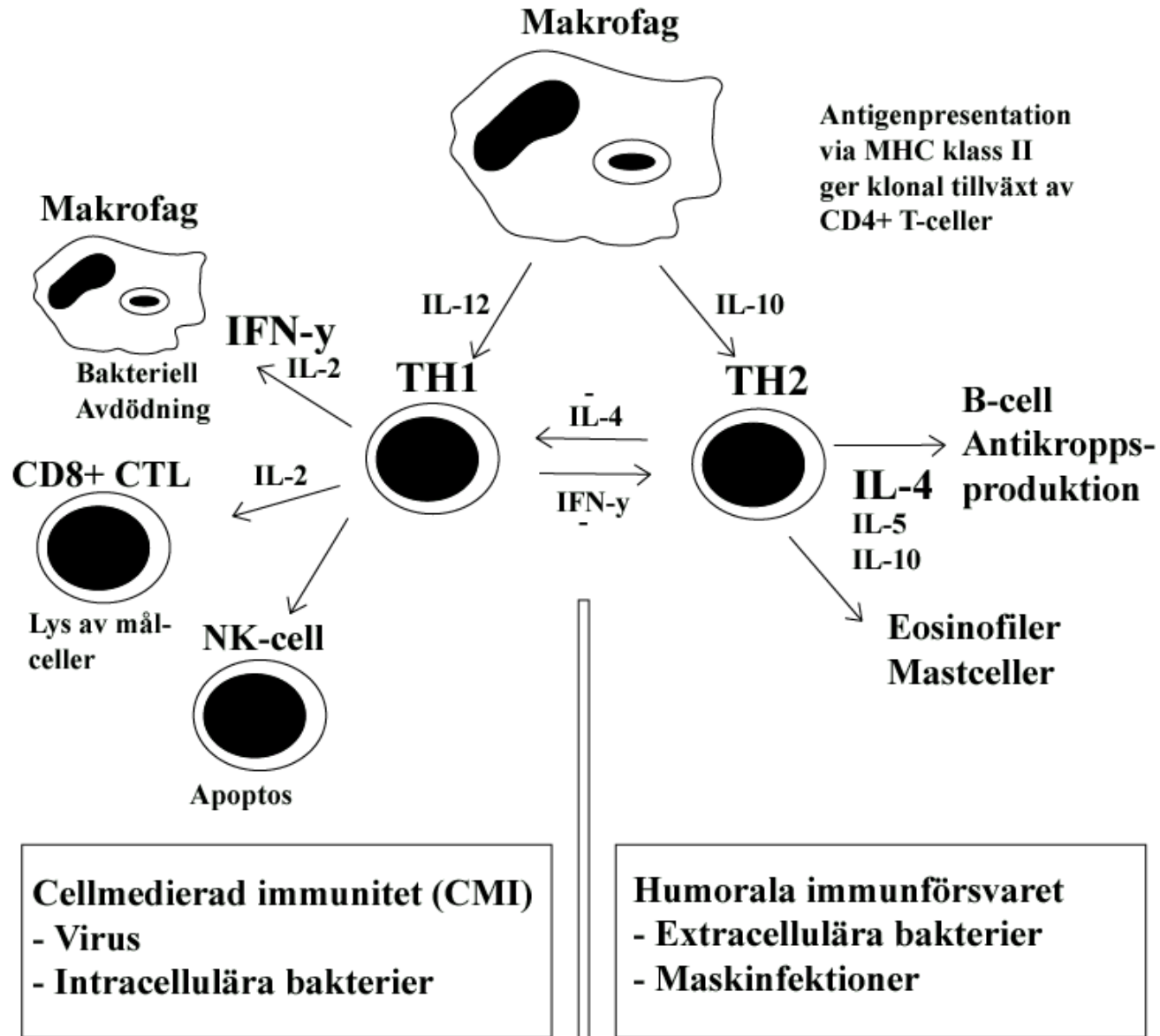


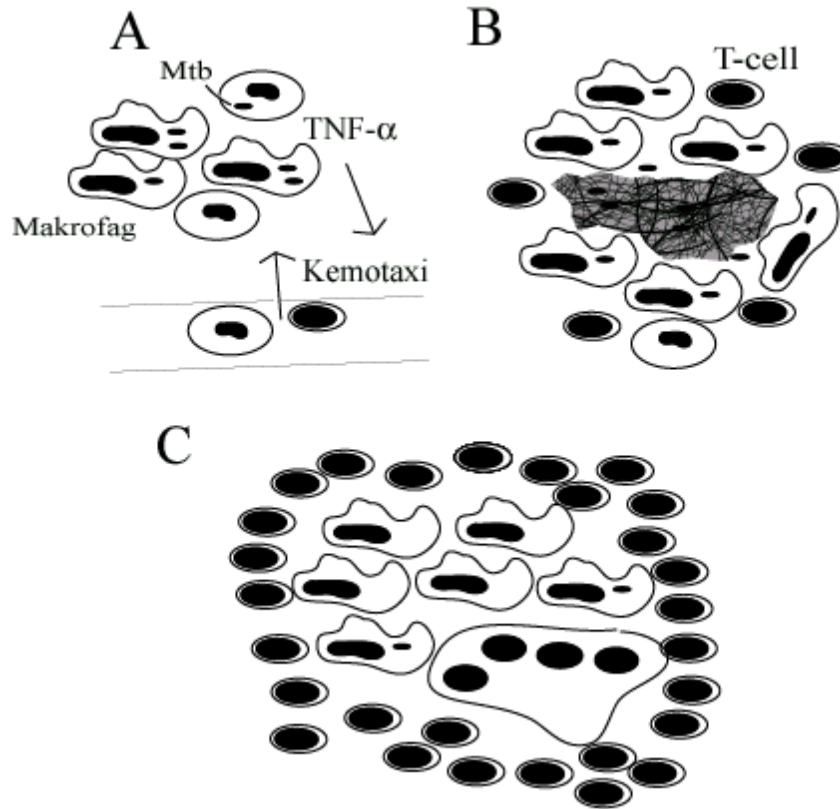
Ny immunologisk diagnostik

Judith Bruchfeld
Infektionsläkarföreningen
Ulvsunda

Immunologiska grunder (Thomas Schön)



Immunopatologi - TB



A. Tidigt immunsvaret via alveolära makrofager leder till inflöde av leukocyter.

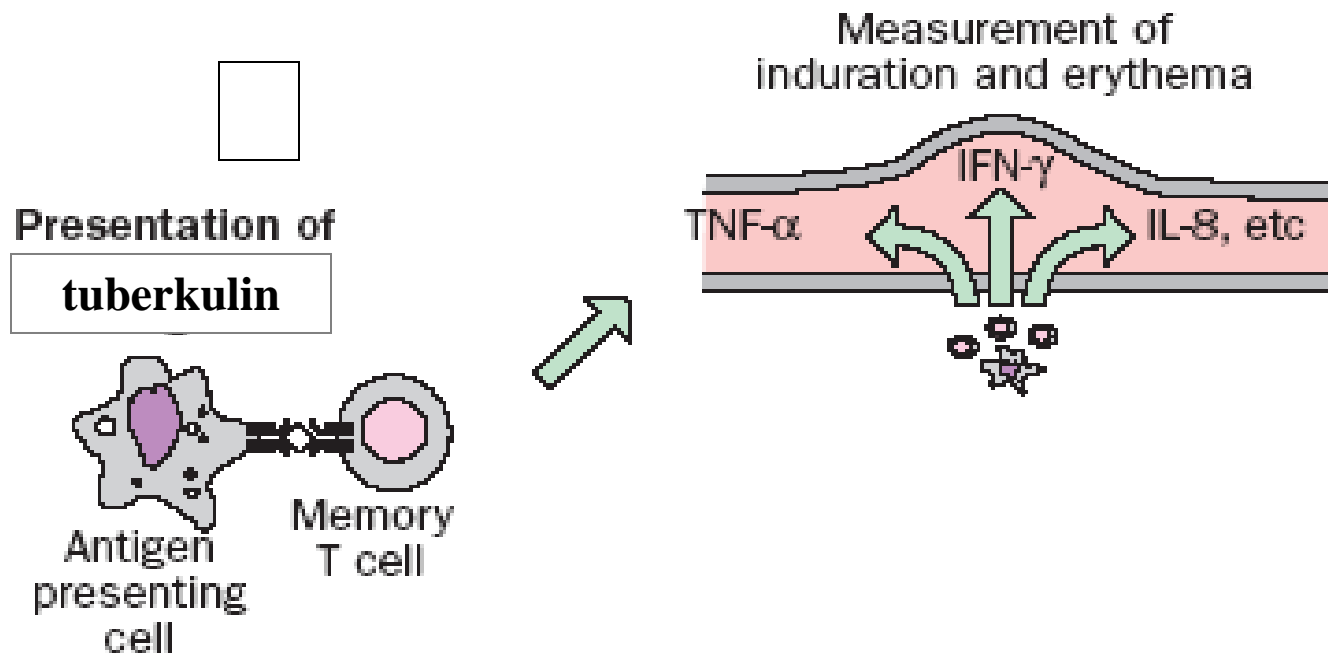
B. Partiellt aktiverade makrofager, nekrotiskt centrum.

C. Makrofagaktivering, avdödning av Mtb, balans mellan Mtb och cellmedierat immunsvaret. Latensfas.

TB-immunologi – snabbversionen:

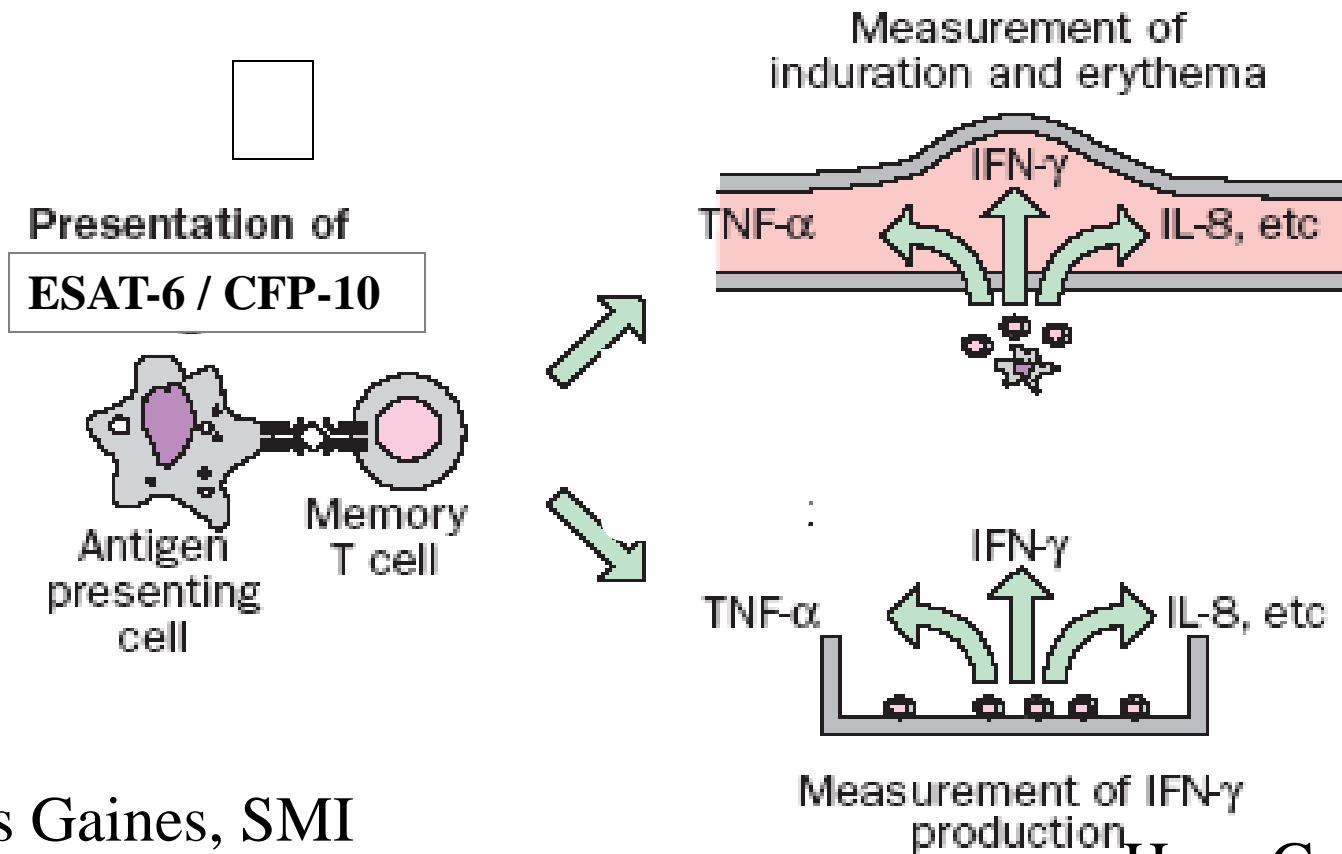
Fagocytos – Tidigt immunsvaret – TNF alfa-Cellmedierat immunsvaret – Th1-celler–TNF alfa-IFN-gamma – Makrofagaktivering – Avdödning av Mtb

Mantoux test (PPD) for TB-reactivity



Hans Gaines, SMI

Laboratory tests for TB-reactivity



Hans Gaines, SMI

Hans Gaines, SMI

Tuberculin antigens present in

Tuberculosis complex

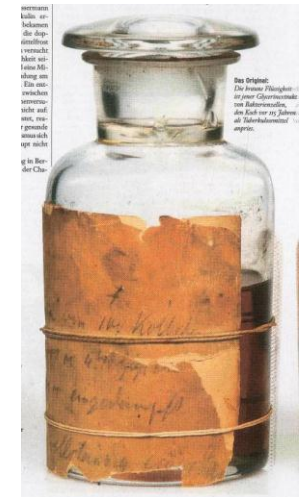
M tuberculosis
M africanum
M bovis

BCG vaccine-strains

M bovis danish substrain
M bovis glaxo substrain
M bovis gothenburg substrain
M bovis montreal substrain
M bovis moreau substrain
M bovis pasteur substrain
M bovis tice substrain
M bovis tokyo substrain

Environmental strains (NTM)

M abcessus
M avium
M branderi
M celatum
M chelonae
M fortuitum
M gordonii
M intracellulare
M malmoense
M oenavense
M scrofulaceum
M smegmatis
M terrae
M vaccae
M xenopi
M kansasii
M marinum
M szulgai



Tuberculin

Antigens specific to *M. tuberculosis*

Early secretory antigenic target 6 (ESAT-6)

Culture filtrate protein 10 (CFP-10)



Peter Andersen 1995
Statens Serum Institut



ESAT-6 and CFP-10 antigens present in

Tuberculosis complex

M tuberculosis
M africanum
M bovis

BCG vaccine-strains

~~*M bovis* danish substrain~~
~~*M bovis* glaxo substrain~~
~~*M bovis* gothenburg substrain~~
~~*M bovis* montreal substrain~~
~~*M bovis* moreau substrain~~
~~*M bovis* pasteur substrain~~
~~*M bovis* tice substrain~~
~~*M bovis* tokyo substrain~~

Environmental strains (NTM)

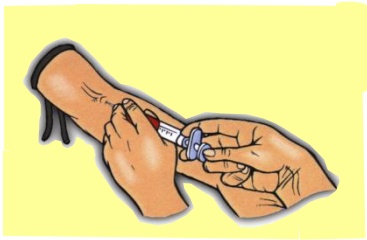
~~*M abscessus*~~
~~*M avium*~~
~~*M branderi*~~
~~*M celatum*~~
~~*M chelonae*~~
~~*M fortuitum*~~
~~*M goodii*~~
~~*M intracellulare*~~
~~*M malmoense*~~
~~*M neoavense*~~
~~*M scrofulaceum*~~
~~*M smegmatis*~~
~~*M terrae*~~
~~*M vaccae*~~
~~*M xenopi*~~
M kansasii
M marinum
M szulgai



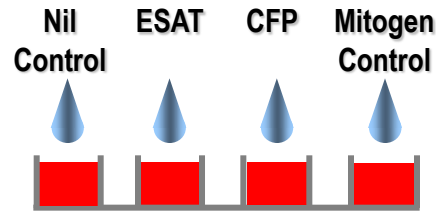
ESAT-6
CFP-10

Quantiferon TB (Cellestis Limited, Melbourne, Australia)

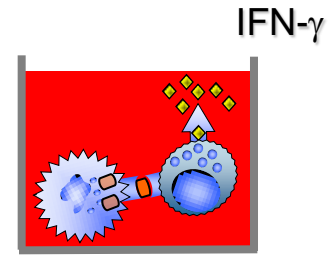
Stage 1 Whole Blood Culture




Heparinized whole blood
Minimum 5 mL

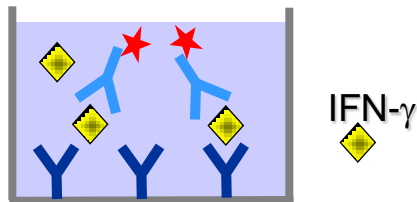


Transfer undiluted whole blood
into wells of a culture plate
and add antigens

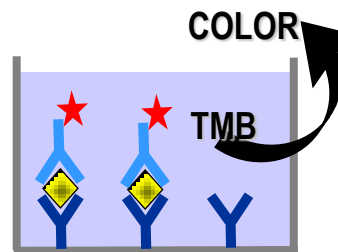


Culture overnight at 37°C
TB infected individuals respond
by secreting IFN- γ 

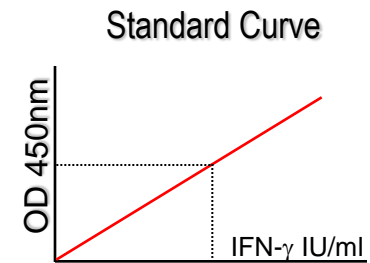
Stage 2 IFN- γ ELISA



Harvest plasma from above
settled cells and incubate 2 hrs in
'Sandwich' ELISA



Wash, add substrate,
incubate 30 min
then stop reaction



Measure OD,
determine IFN- γ levels
and interpret test



T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford, UK)

Step 1 Collect the blood sample in a Cell Preparation Tube and centrifuge to separate Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

Before Centrifugation: Whole blood, Plasma, Gel, Dense solution, Red blood cells

After Centrifugation: PBMCs (Monocytes, B cells, T cells (Effector and Memory T cells)), Plasma, Gel, Dense solution, Red blood cells

Step 2 Wash and count the PBMCs using a microscope and counting chamber or simply run them on a haematology analyser

Step 3 Add PBMCs to wells with antigens and incubate overnight (37°C, CO₂)

Antigen, Effector T cell, Cytokine, Cytokine antibody, Pre-coated well

Step 4 Wash and add secondary antibody

Secondary antibody

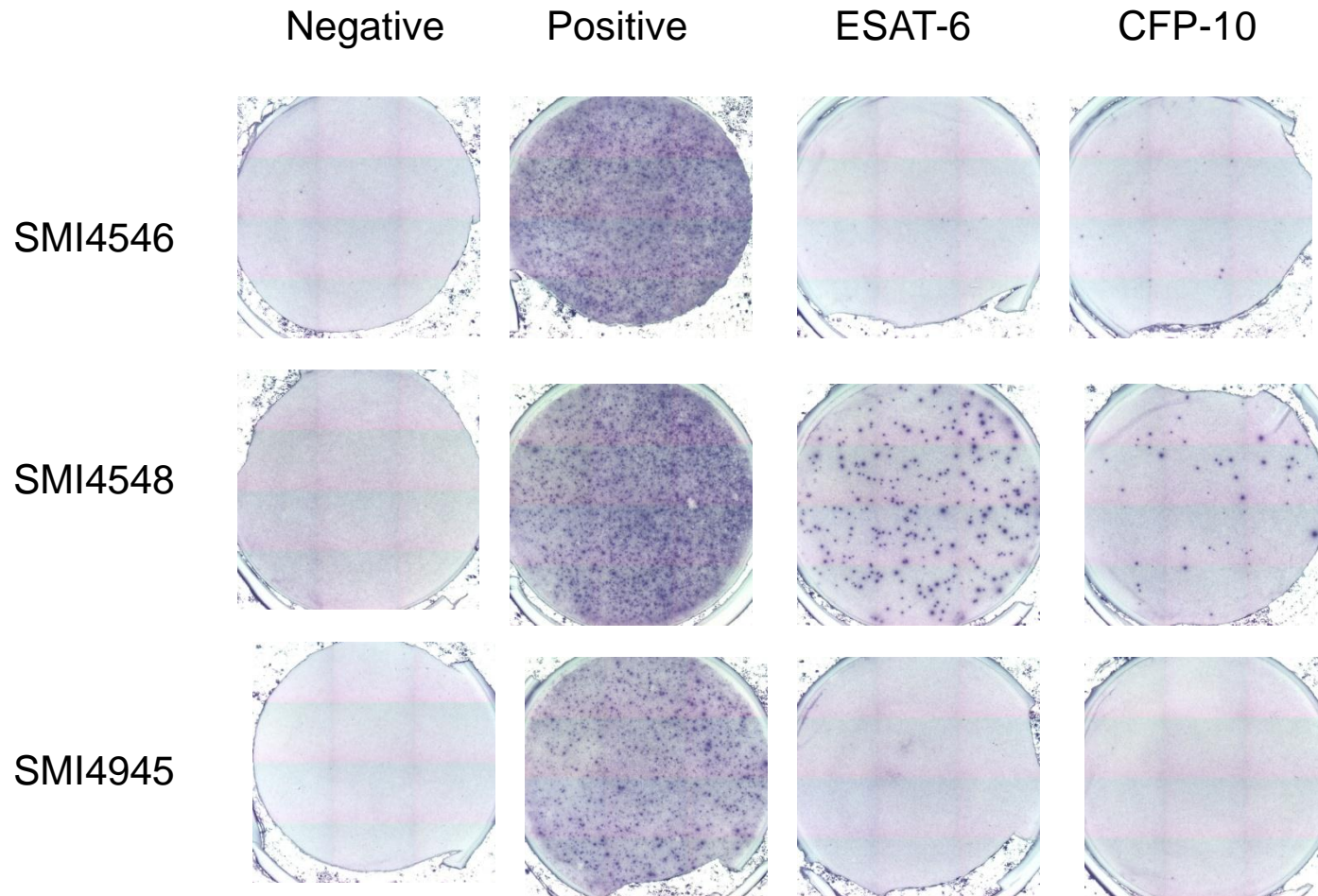
Step 5 Wash and add substrate

Step 6 Count spots
One spot = one T cell

Reactive		Non Reactive
	Nil Control	
	Panel A antigen	
	Panel B antigen	
	Positive Control	



T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford, UK)



Diagnostik av latent tbc

- Liksom PPD visar ett positivt IGRA test att ett immunsvär mot tuberkulosantigen föreligger, kan dock inte
 1. ange om sann infektion med *M. tuberculosis* föreligger
 2. om denna ligger nära eller längre bort i tiden (betydelse för risk för aktivering).
 3. kan inte skilja mellan aktiv och latent infektion
- "Both tests are measuring the wrong thing but the IGRA:s are doing it more specifically" (Hans Rieder).
- Predicerar ett positivt IGRA risk för senare aktivering? Användbarhet hos immun-supprimerade?

Vilka biomarkörer kan skilja mellan latent infektion och aktiv tbc?

- Pågående försök att förbättra IGRA tester genom att inkludera
 1. Andra antigen (ex Rv2628 för att kunna skilja ex "remote LTBI" mot "recent" eller aktiv tbc)
 2. Mäta ytterligare cytokin/chemokinprofiler (IP10, IL2 etc)

Aktuella forskningsfält

- Cytokinprofiler "area of future research" för att skilja mellan aktiv och latent tbc samt differentiera latent tbc med risk för senare aktivering/ej risk för aktivering (Anjit Lalvani UK)
- Hypotes: skillnad mellan "effector memory" (ex IFN-gamma-produktion) och "central memory" (ex IFN gamma och IL2 produktion)

Diagnostik av aktiv tbc

- IGRA-tester: sensitivitet vid aktiv tbc ca 80-85% för QFT, 90-95% för T-Spot TB (generellt högre för båda tester vid EPTB).
- IGRA tester, ffa T-spot TB högre känslighet än PPD men PPD likvärdigt med T-spot TB om 10 mm cut-off används

Chee CBE, GAN SH, KhinMar KW et al. Sensitivity comparison of two commercial interferon gamma release assays in pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 2008 46(6):1935-40

- Studier av T-spot TB på andra kroppsvätskor än blod redovisades (pleuravätska, likvor, BAL) - lovande resultat men i likhet med studier på blod vid aktiv tbc relativt låg specificitet.
- Dock anges likvor som ett mer intressant compartment med mindre risk för kontakt med övriga immunsystemet-dvs ökad specificitet.
- OBS! T-spot TB ej godkänt ännu för annan diagnostik än på blod

Diagnostik av aktiv tbc

- Enligt Madhukar Pai bör huvudstrategin vid diagnostik av aktiv tbc vara andra diagnostiska metoder än IGRAs och rekommenderas ej i kanadensiska guide-lines 2010
- "Go for the bug"!
- Angivande av IGRAs sensitivitet/specificitet vid diagnostik av aktiv tbc räcker inte längre!
- Den additiva effekten av IGRAs jämfört med andra diagnostiska metoder måste framgå vid utvärdering (diagnostiska algoritmer).

Diagnostik av aktiv tbc

- Kan dock, i likhet med PPD, fungera som indirekt hjälpmedel hos "difficult to diagnose" patienter i låg-endemiskt område, ex tbc hos barn, disseminerad eller extrapulmonell tbc/tbc vid immunsuppression
- I endemiskt område möjligt att kombination av direktmikroskopi, PPD och IGRA kan fungera som "rule-out" test
- T-cell interferon-gamma release assays for the rapid immunodiagnosis of tuberculosis: clinical utility in high-burden vs low-burden settings. Dheda K, van Zyl Smit, Badri M, Pai M. Curr Opin Pulm Med 2009, 15:188-200.
- Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: sensible or silly? Lange C, Pai M, Drobniewski F, Migliori GB. Editorial Eur Resp J 2009;33:1250-1253