



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů (KLI)

Bakalářská práce

Využití metod Interferon- gamma release assay (IGRA) v laboratorní diagnostice tuberkulózy

Vypracoval: Marcela Bednářová
Vedoucí práce: MUDr. Jana Amlerová
České Budějovice 2014

Abstrakt

Metody Interferon-gamma release assay (IGRA) se staly již běžnou součástí rutinní diagnostiky tuberkulózy. Jedná se o diagnostiku nepřímou, tedy průkaz reakce buněčné imunity na přítomnost tuberkulózních antigenů v organismu člověka. Jejich princip je detekce interferonu gama produkovaného lymfocyty T senzibilizovanými tuberkulózními antigeny. V současné době jsou k dispozici dva testy (QuantiFERON®-TB Gold In-Tube a T-SPOT®.TB). V této bakalářské práci byl popsán princip IGRA metod, jejich využití v praxi, jejich místo v komplexní diagnostice tuberkulózy. V praktické části byl vyhodnocen soubor 1554 vzorků krve, které byly v období od 1. června 2011 do 30. června 2013 vyšetřeny metodou QuantiFERON®-TB Gold In-Tube v Laboratoři pro diagnostiku mykobakterií Fakultní nemocnice v Plzni. Byl zde sledován podíl jednotlivých typů zdravotnických zařízení indikujících toto vyšetření, dále pak podíl pozitivních, negativních a neurčených výsledků u vybraných indikačních skupin pacientů (vyšetření před aplikací biologické léčby, u pacientů s primárním tumorem plic, u osob z rizikových skupin a u osob v kontaktu s aktivní formou nemoci). Byly posouzeny i výsledky u osob s aktivní tuberkulózou kultivačně ověřenou. Výsledky této práce prokázaly, že IGRA metody jsou velkým přínosem v diagnostice tuberkulózy, a to zejména latentní, ale za jistých podmínek i aktivní. Zároveň je nutné upozornit, že diagnostika tuberkulózy musí být vždy komplexní. Tato metoda nesmí sloužit k diagnostice jako metoda jediná.

Klíčová slova: tuberkulóza – diagnostika – interferon - quantiferon

Abstract

Interferon- γ release assay (IGRA) methods have become a common part of the routine tuberculosis (TB) diagnosis. These are indirect diagnostic methods, which detect the cell-mediated immune reactivity to the presence of *Mycobacterium tuberculosis* antigens inside the human body. The methods are based on the principle of detection of interferon- γ (IFN- γ) produced by the T-lymphocytes sensitized by TB antigens. Currently, there are two tests available (QuantiFERON® -TB Gold In -Tube and T - SPOT®.TB). This thesis is dealing with the principle, the practical use and the place of IGRA methods in the comprehensive diagnosis of TB. The Collection of 1554 blood samples, examined by QuantiFERON®-TB Gold In-Tube in the period from 1st June 2011 to 30th June 2013 in the Mycobacteriology Laboratory of the University Hospital in Pilsen was evaluated in the practical part. The percentage of various types of health care settings indicating this examination, as well as the percentage of positive, negative and undetermined results in some selected groups of patients (screening before the initiation of biological treatment, in patients with primary lung tumors, in person with a high-risk of TB and person in contact with active form of the disease) was monitored. The results of patients with active TB verified by culture were also assessed. The results of this study indicated, that IGRA methods are of a great contribution in the TB diagnosis, in particular in the latent form, under certain conditions also in the active form. At the same time it should be mentioned, that the diagnosis of tuberculosis must always be complex. This method should not be used for the TB diagnosis solely.

Key words: tuberculosis – diagnostics – interferon - quantiferon

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu své kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 5. 5. 2014
	Marcela Bednářová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat MUDr. Janě Amlerové za odborné vedení bakalářské práce a za její laskavý a trpělivý přístup při jejím zpracování.

Dále bych chtěla poděkovat kolektivu Ústavu mikrobiologie, Laboratoře pro diagnostiku mykobakterií za podporu a spolupráci. A nakonec bych zde ráda poděkovala své rodině za podporu a toleranci.

Obsah

1. Teoretická část	7
1.1. Úvod	7
1.2. Historie	8
1.3. Tuberkulóza.....	9
1.4. Statistika výskytu TBC.....	10
1.5. Vakcinace	12
1.6. Mycobacterium tuberculosis komplex	13
1.6.1. Mycobacterium tuberculosis	14
1.6.2. Přenos <i>Mycobacterium tuberculosis</i> na hostitele a šíření v organismu	16
1.6.3. Imunitní reakce organismu na přítomnost <i>M. tuberculosis</i>	17
1.7. Diagnostika tuberkulózy.....	19
1.7.1. Test podle Mantoux.....	22
1.7.2. IGRA metody	23
1.7.2.1. QuantiFERON [®] -TB Gold In-Tube	24
1.7.2.2. T-SPOT [®] .TB test.....	28
1.7.2.3. Zařazení IGRA testů do standardních postupů	30
2. METODICKÁ ČÁST	32
3. VÝSLEDKY	38
4. DISKUZE	42
5. Seznam informačních zdrojů	48

1. Teoretická část

1.1. Úvod

Včasná diagnostika tuberkulózy je i v dnešní době velice důležitou, ale někdy velice komplikovanou záležitostí. Především tomu tak je u osob z rizikových skupin, jako jsou například cizinci, bezdomovci, ale především imunosuprimovaní pacienti, mezi něž patří v první řadě nemocní s nádorem plic nebo nemocní autoimunitními chorobami (např. revmatoidní artritidou, lupenkou nebo nemocemi střev). V určitých případech je potřeba diagnostikovat i tuberkulózu latentní, například před zahájením biologické tj. anti-TNF terapie nebo při sledování osob, které byly v kontaktu s pacientem s otevřenou tuberkulózou. V klinické praxi se běžně využívá tuberkulínového testu. Ten má však své limity, a proto se stále více používají metody IGRA, které diagnostiku tuberkulózy doplňují a upřesňují.

1.2.Historie

Tuberkulóza (TBC) existovala už před mnoho staletími, jak zaznamenal antický historik Hérodotos. Již ve 4. století před naším letopočtem popsal příznaky plicní tuberkulózy. Tato nemoc byla v dávné historii považována za onemocnění živočišné říše a na člověka se přenesla až s domestikací skotu (8000-4000 let př. n. l.). Důkazem výskytu tohoto onemocnění jsou i charakteristické změny na kosterních nálezích starověkého Egypta, Řecka nebo Říma. Avšak nejstarší jednoznačný nález pochází z pozůstatků bizona starého zhruba 18 000 let [Rotschild a spol., 2001].

Hippokratés označil tuberkulózu za nejrozšířenější chorobu své doby. Ve spisech starých Řeků byla tuberkulóza označována jako phthisis neboli vyhubnutí nemocného člověka. Později se začalo používat označení součotiny nebo úbytě. V 17. století byla francouzským lékařem Sylviem Deleboe provedena první pitva, při které se našly v plicích a střevních tkáních uzlíky sýrovité hmoty. V roce 1689 tyto uzlíky podrobně popsal jako tuberkuly Richard Morton. Avšak název tuberkulóza zavedl až v roce 1834 Johann Lukas Schönlein právě odvozením od těchto charakteristických nálezů. Nejvýznamnějším jménem úzce spjatým s touto chorobou je Robert Koch. Jedná se o německého bakteriologa a nositele Nobelovy ceny za lékařství. Roku 1882 (v tomto období na TBC umíral každý sedmý člověk) objevil bakterii způsobující toto onemocnění - *Mycobacterium tuberculosis*, do nedávna nazývanou Kochovým bacilem. Tímto objasnil, že se nejedná o chorobu geneticky podmíněnou či způsobenou špatnou životosprávou, jak se lidé do 19. století domnívali, ale jedná se o infekční onemocnění [Jireš, 2005; Beran, Havlík, 2008].

První lék na tuberkulózu byl objeven američanem Selmanem Waksmanem ve 40. letech minulého století. Jednalo se o streptomycin. Další léky byly objeveny v 50. letech, což vedlo k poklesu nemocných [Kaufann a van Helden, 2008].

1.3. Tuberkulóza

Onemocnění tuberkulózou je již od dávných časů jedním z nejrozšířenějších infekčních onemocnění na světě. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) byla v roce 2011 nakažena až jedna třetina populace (zahrnuta latentní i aktivní forma onemocnění). Ročně na TBC zemřou dva až tři miliony lidí.

Tuberkulóza vždy byla a je především sociální chorobou. Na její rozvoj mají vliv například špatné sociální podmínky, nezdravý způsob života a v neposlední řadě oslabená imunita. Za špatných životních podmínek dochází k nárůstu případů tohoto onemocnění. Dokladem je například v minulosti nárůst onemocnění během první a druhé světové války [Křepela, 1995]. V dnešní době k ohroženým skupinám patří bezdomovci, alkoholici, drogově závislí, lidé ve výkonu trestu, nemocní s karcinomem plic nebo imunosuprimovaní pacienti. Velmi ohroženi jsou samozřejmě lidé v okolí nemocného s aktivní formou této nemoci. Vstupní branou infekce tuberkulózy jsou především plíce. Nejčastější formou této nemoci je proto forma plicní, avšak může se vyskytovat kdekoli v těle včetně kostí a nervového systému. Jedná se o infekční bakteriální onemocnění, přenášené z osoby na osobu pomocí infikovaných kapének, které vystupují z plic nemocného s aktivní formou této choroby. Mezi hlavní klinické příznaky je řazen přetrvávající kašel, bolesti na hrudi, dušnost, chronická únava, hubnutí, noční pocení či u rozvinuté infekce vykašlávání krve. Nicméně u latentní formy tuberkulózy nemusí být příznaky žádné. U většiny lidí, kteří jsou vystaveni tuberkulóze, se nikdy příznaky neprojeví, protože bakterie mohou žít v neaktivní formě v těle. Ale v případě, že je imunitní systém oslaben, jako například u pacientů věkově starších, v případě podvýživy (v důsledku alkoholických či drogových závislostí) nebo při nákaze virem HIV, se mykobakterie mohou aktivovat [Doctors without borders].

Diagnostika tuberkulózy je vždy komplexní proces složený z mnoha částí. Při podezření na onemocnění tuberkulózou se provádí následující diagnostické kroky: odebrání anamnézy, klinické vyšetření, vyšetření zobrazovacími metodami, kožní

tuberkulinový test, krevní testy a mikrobiologické vyšetření klinického materiálu podle lokalizace patologického procesu, nejčastěji sputa. Léčba tuberkulózy není komplikovaná, ale trvá minimálně 6 měsíců a léčí se vždy kombinací antituberkulotik. Základní antituberkulotika, jsou rifampicin, isoniazid, pyrazinamidu, ethambutol a streptomycin. Léčba je pro pacienta náročná, antituberkulotika mohou mít řadu nežádoucích účinků a v první fázi léčby musí být pacient izolován. Ještě náročnější je léčba tuberkulózy způsobné rezistentními kmeny bakterie (například multi drug rezistentní tzv. MDR), někdy může trvat až do konce života. [American lung association].

1.4. Statistika výskytu TBC

Podle statistik Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS) bylo v České republice v roce 2011 nahlášeno 609 nových nemocných a recidiv všech forem TBC, což představuje 5,8 nemocných pacientů s tuberkulózou na 100 000 obyvatel. Avšak podíl recidiv představoval jen 1,5 %. Statistické přehledy dále uvádějí, že muži se na výskytu TBC podíleli v 71 %, konkrétně tedy v 434 případech. Majoritně jsou v této statistice zastoupeni pacienti s tuberkulózou dýchacího ústrojí, počet hlášených případů činil 557 osob, tzn. 5,3 pacientů na 100 000 obyvatel. Z tohoto počtu bylo 528 pacientů s tuberkulózou plic.

Nejvíce hlášených nemocných bylo v hlavním městě - Praze. Jednalo se o 134 pacientů, což představuje 10,8 pacientů na 100 000 obyvatel. Prahu následoval Plzeňský kraj s počtem 7,9 pacientů s TBC na 100 000 obyvatel. Naopak dlouhodobě nejpříznivější situace byla v Jihočeském kraji, kde hlášenou incidenci představovali pouze 3 pacienti TBC na 100 000 obyvatel.

Z celkového počtu 609 nových ohlášených pacientů s tuberkulózou bylo 41 případů u bezdomovců, z toho 20 případů z Prahy. Dále pak bylo zjištěno 31 případů u vězňů a 15 případů u zdravotníků.

Dále z celkového počtu hlášených nemocných s tuberkulózou dýchacího ústrojí bylo 74 % bakteriologicky ověřeno. Mikroskopicky pozitivních nemocných s tuberkulózou plic, tedy z epidemiologického hlediska nejzávažnější formou TBC, bylo zjištěno 196.

Statisticky nejvíce se toto onemocnění objevuje u osob starších 75 let a u mužů je možno pozorovat vyšší výskyt TBC už ve středním věku, tzn. 40-44 let a více. Mezi dětmi ve věku 0-14 let bylo v roce 2011 zjištěno pouhých 6 pacientů, z toho tři novorozenci, jedno dítě dvouleté a jedno dvanáctileté.

Počet cizinců, osob narozených mimo ČR, činil 18 %, tedy 112 případů, z celkové notifikace. Tradičně nejvíce pacientů cizinců bylo hlášeno z Ukrajiny, dále pak ze Slovenska, Vietnamu a Mongolska. Zajímavostí je hlášení případu nemocného z Nigérie, kde původcem tuberkulózy bylo *Mycobacterium africanum* (jeden z druhů komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, v ČR izolovaný poprvé).

S hlášenou incidencí TBC 5,8 na 100 000 obyvatel se Česká republika řadí k zemím s nejnižším výskytem TBC v Evropě.

Rok 2011 je prvním rokem po zrušení povinné plošné vakcinace proti tuberkulóze, na epidemiologické situaci se to nijak neprojevalo. Výskyt TBC u dětí zůstává naprosto minimální, až ojedinělý, a nedošlo k nárůstu ani u rizikových skupin, jakými jsou bezdomovci nebo cizinci. Vše vztaženo proti statistikám z roku 2010, kdy bylo plošné očkování povinné [ÚZIS].

1.5. Vakcinace

První vakcína proti TBC byla vyvinuta roku 1908 Albertem Calmettem a Camillem Guerinem z kmene *Mycobacterium bovis*, získaného z krávy nemocné tuberkulózní mastitidou. Následovala kultivace na půdě, která byla připravená z plátů vařených brambor a hovězí žluči s přídavkem glycerolu. Toto pasážování trvalo celých 13 let, až se zvířecí virulence vytratila a zároveň došlo k fenotypové změně mykobakterie. Vakcína byla pojmenována podle objevitelů – BCG (bacil Calmett-Guerin). V roce 1921 byla poprvé podána. Následně byla aplikována u více než miliardy lidí. Vakcína obsahuje mykobakteriální zárodky (živé i neživé), které udávají sílu této očkovací látky. BCG vakcína v těle vyvolá aktivaci buněčné imunity. Následně dojde k produkci lymfocytů, které mykobakterie rozpoznají a zničí [Beran, Havlík, Vonka. 2005].

Povinné očkování bylo v ČR zavedeno koncem 40. let 20. století. V té době se také snížil počet tuberkulózu nakažených pacientů o 60 až 80 %. Přes obrovskou účinnost vakcinace proti TBC se v zemích s dlouhodobě nízkým výskytem této choroby od povinného očkování upouští. Rozhodnutí o zrušení očkování jsou provedena na základě epidemiologický i klinických studií. Tak je tomu i v ČR, do listopadu roku 2010 bylo očkování proti TBC dáno zákonem č. 258/2000 Sb. O ochraně veřejného zdraví, vyhláškou č. 537/2006 Sb. O očkování proti infekčním nemocem. Avšak 1. 11. 2010 byla změněna vyhláškou č. 299/2010 Sb. O očkování proti infekčním nemocem, ve které je možno se dozvědět o zrušení celoplošného povinného očkování proti této chorobě. Dále se v této vyhlášce uvádí, že nadále budou očkovány jen rizikové skupiny dětí a dospělých [Všeobecná zdravotní pojišťovna ČR].

V ČR je k dispozici dánská BCG VACCINE SSI, živá oslabená vakcína, která je pro očkování proti TBC využívána nejhojněji. Tato vakcína je připravena pro imunizaci novorozenců, dětí s negativní tuberkulínovou reakcí i pro mladistvé a dospělé osoby.

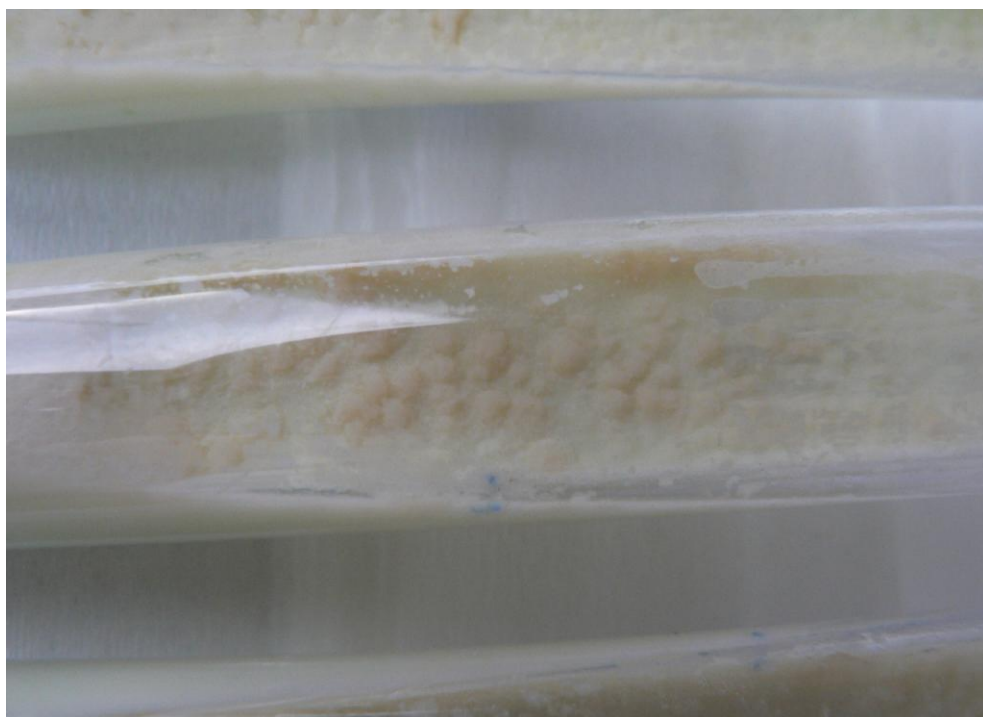
Dále je v této republice registrována i vakcína BCG – VACCINE BEHRING, vyráběná v SRN, LYOPHILIZED BCG VACCINE vyráběná ve Francii a VACCINUM TUBERCULOSICUM, jenž pochází z Ruska [Beran, Havlík, Vonka. 2005].

1.6. Mycobacterium tuberculosis komplex

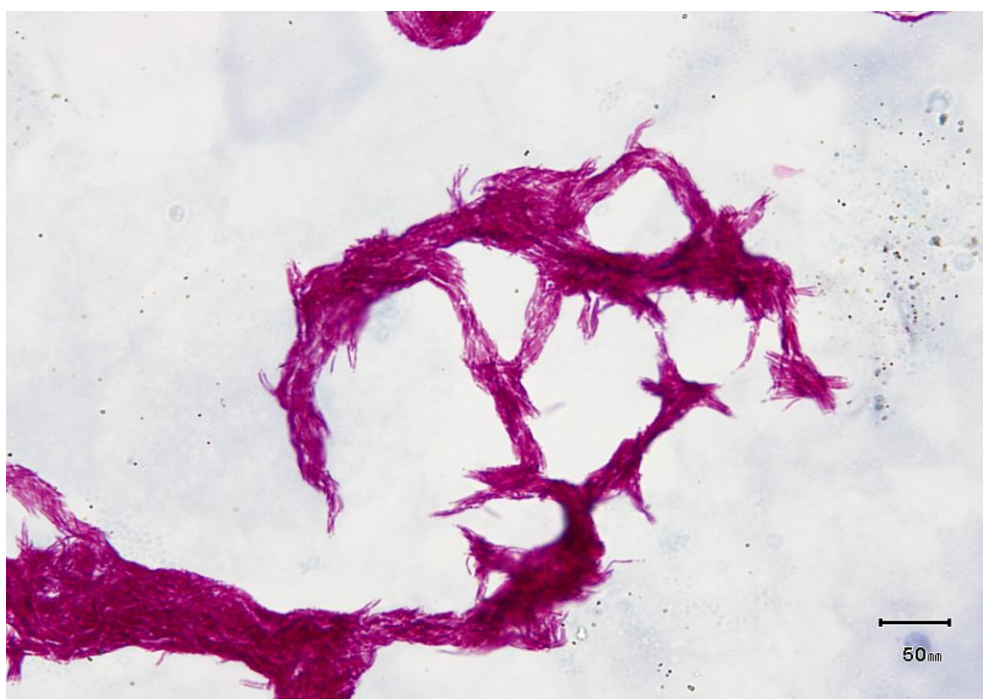
Původcem tuberkulózy je *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tbc*), tato bakterie spolu s *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis* a *Mycobacterium bovis* BCG (*Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette--Guérin) tvoří komplex *Mycobacterium tuberculosis*. Mykobakteria zahrnutá do tohoto komplexu se vyznačují velmi vysokou sekvenční podobností genomů, jedná se až o 99,9% shodu, a identickými sekvencemi rRNA. V čem se ale liší, je preference hostitelů. *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* a *Mycobacterium canettii* jsou lidské patogeny, *Mycobacterium microti* je patogenem hlodavců a *Mycobacterium bovis* BCG je kmen vakcinační. Avšak *Mycobacterium bovis* má spektrum hostitelů širší [Macela, 2006].

1.6.1. *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis je aerobní mikroorganismus. Jedná se o nepohyblivé nesporulující acidorezistentní tyčinky obtížně barvitelné Gramem, z řádu Actinomycetales. *Mycobacterium tuberculosis* je pleiomorfní bakterie, někdy má tvar vláken, jindy protáhlých koků, nejčastěji středních štíhlých granulovaných tyčinek. U této bakterie je nutno se zmínit o unikátní stavbě její buněčné stěny. Na rozdíl od grampozitivních i gramnegativních bakterií je buněčná stěna extrémně hydrofóbní a to díky velmi vysokému obsahu lipidů a také díky vrstvě kyseliny mykolové. Ta je kovalentně či nekovalentně vázána k buněčné stěně. Buněčná stěna, respektive její peptidoglykanová vrstva, je kryta polysacharidem arabinogalaktanem. Do této struktury jsou zakotveny bioaktivní složky. Důležitým zástupcem těchto složek je lipoarabinomanan (LAM). Jeden z jeho tří typů je zakončený manózovými zbytky (ManLAM) a přímo inhibuje odpověď makrofágů na mykobakteriální infekci. Také má inhibiční účinky na funkce dendritických buněk a tlumí proliferaci a aktivaci T-buněk. Další významnou složkou této buněčné stěny u virulentních mykobakterií je ftiocerodimykokerozát (PDIM). V dnešní době je považován za přímý faktor virulence. Další faktory přispívající k virulenci, jsou sulfolipidy, ovlivňující osud fagozomů, potlačují snižování pH ve fagozomech a tím zabraňují splývání fagozomů s lysozomy. Díky těmto schopnostem dokáže *M. tuberculosis* přežít v makrofázích hostitele, což je podstata virulence této bakterie. *M. tuberculosis* netvoří žádné toxiny [Macela, 2006; Votava, 2005].



Obrázek č. 1: *Mycobacterium tuberculosis* – růst na kultivační půdě Löwenstein-Jensen
[MUDr. Amlerová]



Obrázek č. 2: *Mycobacterium tuberculosis* – barvení podle Ziehl-.Neelsena, zvětšení 1000x
[MUDr. Amlerová]

1.6.2. Přenos *Mycobacterium tuberculosis* na hostitele a šíření v organismu

Nejčastější formou přenosu mykobakteriální infekce je inhalace infikovaných kapének od nemocného člověka. Mykobakterie mohou být ve vzduchu velmi dlouho a šířit se do velkých vzdáleností. Možností nákazy je také inhalace infikovaného prachu nebo alimentární cesta při nedostatečné hygieně. První proniknutí mykobakterií do organismu a vznik infekce se nazývá primární tuberkulóza. Když tyto bakterie vniknou do organismu, jsou pomocí makrofágů přeneseny do lymfatických uzlin plicního hilu, pokud vstupní branou infekce byly dýchací cesty. Při spolupráci makrofágů a T-lymfocytů dochází k buněčné imunitní odpovědi. Respektive dochází k uvolnění mediátorů zánětu, tedy k uvolnění cytokinů. Dále dochází k aktivaci buněčné obranné reakce, v jejímž důsledku se začínají tvořit imunitní (infekční) granulomy – ohraničené záněty specifického tvaru a složení. Toto infikované ložisko ve spojení s infikovanou lymfatickou uzlinou se nazývá primární komplex. Právě díky tomuto primárnímu komplexu se mohou tuberkulózní mykobakterie šířit do dalších orgánů pomocí lymfatických cest. V těchto napadených orgánech pak vznikají sekundární granulomy, které se, pokud jsou dostatečně velké a virulentní (malé jsou ve většině případů imunitní reakcí zničeny), opouzdří, kalcifikují a následně v „obležení“ chrání *M. tuberculosis*. Tato mykobakteria pak v organismu přežívají různě dlouhou dobu. Právě po tuto dobu hovoříme o latentní tuberkulóze. K reaktivaci tohoto infekčního procesu může dojít při jakémkoliv oslabení imunity a rozvinutí aktivní formy tuberkulózy. Pak se granulomy tvoří prakticky v celém organismu a dochází k tzv. generalizaci infekce. U osob, které prodělaly primární tuberkulózu, vzniká tuberkulóza postprimární. Vzniká několika mechanismy. Jedním z těchto mechanismů je endogenní reaktivace onemocnění. To znamená, že při oslabení organismu dochází k reaktivaci starého, mnohdy neléčeného ložiska. Ložisko obsahuje životaschopné virulentní mykobakterie, které se začnou šířit dýchacími nebo lymfatickými cestami či přímým přestupem do krve (v tomto případě hovoříme o miliárním rozsevu tuberkulózní infekce). Endogenní reaktivace je nejčastější cesta vzniku postprimární

tuberkulózy. Dalšími cestami vzniku této formy tuberkulózy je exogenní superinfekce nebo reinfekce, kdy je organismus vystaven nové exogenní nákaze. Dojde k dalšímu styku s mykobakteriální infekcí [Křepela, 1995].

1.6.3. Imunitní reakce organismu na přítomnost *M. tuberculosis*

Imunitní systém reaguje na přítomnost infekce fagocytózou mykobakterií makrofágy. *Mycobacterium tuberculosis* je intracelulární „parazit“, proto může uvnitř makrofágu přežít a dokonce se i množit. Dochází k produkci cytokinu - interleukinu 12 (IL12), který stimuluje prekursorů pomocných T-lymfocytů (Th- helper) k diferenciaci na podtyp Th1 (CD4+), které opět produkují cytokiny, a to především interferon gama (IFN γ) a membránový tumor nekrotizující faktor (TNF), jež aktivují makrofágy. Aktivovaný makrofág pomocí enzymu indukovatelná syntetáza oxidu dusnatého (iNOS) produkuje z argininu oxid dusnatý, který je vysoce baktericidní. Některé mykobakterie uhynou, jejich bílkoviny jsou rozštěpeny na antigenní polypeptidy. Díky povrchovým glykoproteinům bílých krvinek (MHC II. třídy) se dostávají na povrch makrofágu. Infikované makrofágy jsou rozpoznávány T-buněčným receptorem na povrchu prekurzorů T-lymfocytů. Za pomoci různých dalších povrchových adhezivních a signalizačních molekul se z prekurzorů tvoří klon efektorových Th1 buněk, které produkují interferon gama [Hořejší a Bartůňková, 2001].

Buňky Th1 (CD4+) po styku s antigeny mykobakterií uvolňují také chemokiny, které přitahují monocyty a lymfocyty. Monocyty se mění na makrofágy. Na stejném principu, jako je imunitní reakce organismu proti mykobakteriím, je založena i takzvaná přecitlivělost neboli reakce imunopatologická IV. typu. Jedná se o zánětlivou reakci závislou na spolupráci Th1 lymfocytů a makrofágů. Reakce se nazývá přecitlivělost oddáleného typu neboli DTH (delayed type hypersensitivity), někdy také tuberkulinového typu. V senzibilizovaném organismu vznikají antigeně specifické

Th1 lymfocyty. Tuberkulinová reakce nastává po opětovném setkání s antigenem (tuberkulinem) v místě, kam byl aplikován tuberkulin do organismu, který byl již dříve infikován neboli senzibilizován tuberkulózou. Během 24 až 72 hodin se objeví zánětlivé kožní ložisko. Oddálení reakce je způsobeno tím, že specifické Th1 lymfocyty a makrofágy nejprve migrují k místu vniknutí antigenu a vzájemně se stimulují. Th1 lymfocyty produkují interferon gama, který aktivuje makrofágy. Takto aktivované makrofágy jsou schopné *M. tuberculosis* likvidovat [Hořejší a Bartůňková, 2001].

Základní výzkumy o imunopatologických reakcích v souvislosti s tuberkulózou provedl již v roce 1801 Edward Jenner a v roce 1891 Robert Koch, který popsal takzvaný Kochův reinfekční fenomén. Při pokusu zjistil, že morčeti, kterému naočkoval kulturu bacilů (Kochův bacil – *Mycobacterium tuberculosis*), se v místě očkování vytvořil tuhý ulcerózní uzlík a infekce se šířila do hilových lymfatických uzlin a celého organismu, zvíře zahynulo. Pokud se stejný pokus provedl u morčete, které bylo již očkováno, tudíž se setkalo s antigenem, pak se v místě inokulace za jeden až dva dny objevilo tmavě červené zatvrdnutí, ze kterého postupně vznikl nekrotický plochý vřed. Ten se trvale vyhojil a infekce se nešířila do uzlin ani do organismu. Při senzibilizaci buněk přirozenou infekcí vzniká také nekróza. Vzniká ale tam, kde mykobakterie pronikly do organismu, například v plicích. Pokud je množství infekční dávky malé, nemusí dojít až k nekróze [Křepela, 1995].

1.7. Diagnostika tuberkulózy

Diagnostické kroky k určení tuberkulózního onemocnění jsou velice provázané. Přímá diagnostika tohoto onemocnění je téměř vždy doprovázena diagnostikou nepřímou, která je sice “jen doplňující”, ale zároveň nesmírně přínosná. K přímé diagnostice TBC se využívá kultivace, mikroskopický průkaz či genetický průkaz (např. PCR) nukleových kyselin mykobakterií ve vzorku pacienta. Diagnosticky velmi přínosné je i histologické ověření onemocnění s průkazem specifického granulomatózního procesu s obrovskými buňkami Langhansova typu s kazeózní nekrózou. Součástí diagnostiky TBC je také anamnéza pacienta. Nemocný podává informace o styku se zdrojem nákazy, především s osobou s diagnostikovanou otevřenou formou TBC. Při projevech klinických příznaků je důležité zjistit, jestli pacient netrpí imunodeficiencí (například pozitivita HIV či diabetes mellitus). Neméně důležitým aspektem je sociální a ekonomická zabezpečení pacienta. Zjistíme tím, zda patří do rizikové skupiny, či nikoliv. Dále následuje vyšetření zobrazovacími metodami (rentgen, počítačová tomografie - CT apod.), popřípadě skiografie pro stanovení lokalizace a rozsahu poškozené tkáně. Při podezření na miliární rozsev se využívá hlavně vyšetření CT [Beneš, 2009].

Rentgenový obraz může být velice rozmanitý, avšak jsou zde určité specifické projevy, které lze monitorovat. U plicní formy TBC obvykle dochází k rozvoji infiltrátu v horních plicních lalocích, následně může kazeifikací a kolikvací dojít k rozpadu plicní tkáně se vznikem typické kaverny, což je na RTG obrazu viditelné. Pokud dojde k rozsevu *M. tuberculosis* hematogenní cestou, projeví se onemocnění miliárním rozsevem s drobnouzlíkovými lézemi.

Přímá diagnostika tuberkulózy kultivací je “základním kamenem” pro stanovení diagnózy onemocnění TBC. Jedině pozitivním kultivačním výsledkem, tedy získáním kmene *Mycobacterium tuberculosis* ze vzorku klinického materiálu pacienta, můžeme prohlásit diagnózu TBC za ověřenou. Zároveň tímto jediným způsobem existuje

možnost přesné identifikace kmene a stanovení citlivosti k antituberkulotikům. Kultivační vyšetření na průkaz *M. tuberculosis* se provádí, v souvislosti s tím, že nejčastější forma TBC je plicní, nejčastěji ze vzorku sputa. Správný odběr sputa má být proveden nejlépe před nasazením antituberkulotické léčby, 3 dny po sobě, ráno, před jídlem a hygienou pacientovy dutiny ústní. To z důvodu větší pravděpodobnosti záchytu mykobakterií, jejichž vylučování není během dne kontinuální. Takto odebraný vzorek je nutno před kultivací dekontaminovat, tzn. odstranit běžnou, rychleji rostoucí, nespecifickou mikroflóru. Nejpoužívanější metodou dekontaminace je Petroffova metoda za použití louhu sodného nebo metoda s N-acetyl-L-cysteinem, který zároveň přispívá k homogenizaci vzorku.

M. tuberculosis se k diagnostickým účelům kultivuje na pevných vaječných médiích (Löwenstein-Jensen, Ogawa), případně v tekutých půdách (Šula, Middlebrook). Kultivace na vaječných Löwenstein-Jensen či Ogawa mediích je standardem. Půdy jsou složeny ze solí, asparaginu (respektive glutamátu u půdy Ogawa), glycerinu, škrobu, z teplem koagulovaných vajec a přísady malachitové zeleně (potlačuje růst jiných bakterií). Ovšem i na optimální půdě a za příznivých podmínek roste tato bakterie poměrně dlouho. Z odebraného sputa může kultivace trvat 6 až 9 týdnů. Generační doba *M. tuberculosis* je 37 hodin. Kolonie *M. tuberculosis* mají specifický květákovitý vzhled [Schindler, 2010].

V posledních letech se již rutinně v laboratorních provozech používá kultivace v uzavřeném kultivačním systému – tzv. kultivace metabolická - (Bactec MGIT, MB BacT, MB Redox...). Zde jsou automaticky detekovány metabolické produkty vznikající při množení a růstu mykobakterií nebo naopak spotřeba živin a kyslíku potřebných k růstu mykobakterií. Záchyt mykobakterií se takto ve vzorcích klinického materiálu výrazně zkvalitňuje a urychluje (přístroj detekuje pozitivitu například již po pěti dnech).

Mikroskopický průkaz je rychlou, avšak méně citlivou metodou, která je nezbytná pro první orientaci a včasné zahájení léčby. Z důvodu acidorezistence mykobakterií,

způsobené specifickou stavbou jejich buněčné stěny, je nelze barvit dle Grama. Používá se barvení fluorescenční nebo barvení podle Ziehl-Neelsena [Votava, 2003].

Fluorescenční barvení je založeno na zvýšené afinitě mykologických kyselin mykobakterií k auraminu O, žlutému fluorescenčnímu difenylmethanovému barvivu. Preparát se po promytí pozoruje fluorescenčním mikroskopem. Pozitivní tyčinky mykobakterií svítí žlutě na tmavém pozadí a lze je přebarvit Ziehl-Neelsenovým barvením [Votava, 2003].

Při barvení podle Ziehl-Neelsena se používá koncentrovaný karbolfuchsin (červená barva) aplikovaný za horka. Takto obarvené acidorezistentní mykobakterie pak nelze odbarvit kyselým alkoholem, zatímco jiné, nespecifické, bakterie se kyselým alkoholem (etanol s kyselinou sírovou) odbarví. Dobarvení neacidorezistentních bakterií a dalších struktur se provádí malachitovou zelení nebo metylénovou modří. Na pozitivním preparátu je tedy možno spatřit červené tyčinky mykobakterií a zelenou resp. modrou neacidorezistentní mikroflóru [Votava, 2003].

Genetický průkaz mykobakterií ve vzorku je rovněž metodou urychlující a zpřesňující diagnózu tuberkulózních infekcí. Pro identifikaci mykobakterií se standardně využívá širokospektrá 16S rRNA polymerázová řetězová reakce (16S rRNA PCR) za použití druhově specifických primerů s následnou sekvenční analýzou. Tento rychlý test detekuje nukleové kyseliny *M. tuberculosis*, avšak nerozlišuje genetický materiál živých mikroorganismů a neživotaschopných buněk přetrvávající z předchozích infekcí. Není známo, jak dlouho test PCR může zůstat pozitivní po léčbě tuberkulózy. Tudíž se opět jedná o metodu diagnostiky, která musí být doplněna o výsledky dalších metod.

Kromě metod přímé laboratorní diagnostiky TBC se využívá i diagnostika nepřímá, tedy průkaz reakce organismu na přítomnost infekčního agens.

1.7.1. Test podle Mantoux

Jednou z metod nepřímé diagnostiky TBC je tuberkulínový kožní test někdy nazývaný jako test podle Mantoux, v literatuře též označovaný jako TST – tuberculin skin test nebo PPD test – purifikovaný proteinový derivát. Jeho princip spočívá v intradermálním vpichu čištěného proteinového derivátu z tuberkulózních bacilů (tuberkulínu). Za 72 hodin se provádí odečet indurace (zatvrdnutí, zarudnutí). Za pozitivní výsledek se považuje průměr 5 mm a více. Pozitivní výsledek vykazují také osoby očkované [Nayak, 2012].

Tento test byl v principu vyvinut Robertem Kochem v roce 1890. Intradermální provedení, kterého se využívá i v současnosti, bylo vyvinuto roku 1912 Charlesem Mantoux. Dnes se využívá standardizovanějšího proteinu PPD-S, odvozeného z kultur *Mycobacterium tuberculosis* metodou podle Sieberta. Zajímavostí je, že i přes více než staleté užívání této metody diagnostiky jsou výsledky testu podle Mantoux poměrně kontroverzní. Z imunologického hlediska do těla vpravený tuberkulín vyvolá opožděnou buněčnou reakci. Dochází k uvolňování cytokinů díky spolupráci T-buněk a makrofágů, které u osob, jež se již do kontaktu s bakteriemi *Mycobacterium tuberculosis* dostaly, vyvolají očekávanou induraci.

Test je obvykle prováděn na předloktí levé ruky. Po vpichu 0,1 ml tuberkulínu o síle 2T pomocí 1 ml injekční stříkačky a jehly o velikosti 25-26 je nutno vyčkat 48-72 hodin. Následně může být test vyhodnocen. Základem hodnocení je přítomnost či nepřítomnost indurace. Určení indurace je prováděno pohledem a palpací. Pozitivní reakce na tuberkulín je dána indurací s průměrem od 5 mm, avšak tato mezní hodnota může být proměnlivá v závislosti na individuálních okolnostech. Někdy může dojít k pozitivní reakci na tuberkulín, i když daná osoba není infikovaná *Mycobacterium tuberculosis*. Tato falešná pozitivita může být dána například infekcí netuberkulózními mykobakteriemi, ale v první řadě očkováním vakcínou BCG. U testu podle Mantoux může docházet i k falešně negativním vyhodnocení. K tomuto dochází při neschopnosti jedince reagovat na kožní testy při imunitní deficienci, po nedávném prodělání

tuberkulózní infekce, u novorozenců, po nedávném očkování jinými živými viry (spalničky, neštovice) a po nebo při infekci těmito chorobami, při onemocnění sarkoidózou či Hodgkinovou nemocí, při užívání steroidů, respektive kortikosteroidů, u podvyživeného pacienta a v neposlední řadě při nesprávném provedení tuberkulinového testu [Nayak, 2012].

Právě díky častému výskytu těchto nesprávných interpretací výsledků tuberkulinového testu Úřad pro kontrolu potravin a léčiv FDA (vládní agentura USA) schválil pro diagnostiku tuberkulózy IGRA metodu QuantiFERON[®]-TB Gold (Cellestis Carnegie Victoria, Australia) [Nayak, 2012].

1.7.2. IGRA metody

Mezi další metody nepřímé diagnostiky řadíme tzv. metody IGRA (Interferon-gamma release assay). Jsou to metody založené na sledování produkce interferonu gama aktivovanými Th1 lymfocyty a měření jeho přítomnosti a množství v séru pacienta. Principem těchto testů je detekce interferonu gama produkovaného senzibilizovanými lymfocyty po jejich předchozí stimulaci tuberkulózními antigeny in vitro. Množství interferonu gama se měří v krevní plazmě po několikahodinové inkubaci plné krve ve zkumavce s tuberkulózními antigeny. Pozitivní výsledek znamená, že infekce TBC je pravděpodobná, negativní výsledek, že infekce TBC není pravděpodobná. V těchto metodách se používají antigeny specifické pro *Mycobacterium tuberculosis*, nejsou zde antigeny obsažené ve vakcinačních látkách. Proto se zde neprojevuje zkřížená reaktivita s vakcinačním kmenem *Mycobacterium tuberculosis* BCG. Množství vytvořeného interferonu se zpravidla měří metodou ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) [European Centre for Disease Prevention and Control, 2011].

IGRA metody byly vyvinuty jako alternativa imunodiagnostického přístupu k detekci tuberkulózní infekce. Vznik a vývoj těchto metod byl dán pokrokem ve studiích genomů mykobakterií. Byly označeny genomové segmenty přítomné u komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, ale nepřítomné u vakcinačních kmenů *M. bovis* BCG a většiny netuberkulózních mykobakterií s výjimkou *M. kansasii*, *M. szulgai* a *M. marinum*. Nejdůležitější antigeny čili proteiny kódované podle tohoto segmentu jsou sekreční antigenní cíl 6 (ESAT-6) a filtrát kultury protein 10 (CFP-10) a protein 4 (TB7.7). Jejich schopnost vyvolat silnou specifickou buněčnou odpověď snižuje četnost falešně pozitivních výsledků, jak tomu je u tuberkulinového testu u osob, které byli očkováni BCG vakcínou. Tato důležitá vlastnost se využívá právě u metod IGRA, které jsou v současné době k dispozici [Lalvani, 2010].

Testy IGRA byly původně vyvinuty pro diagnostiku latentní formy tuberkulózy, ale za určitých podmínek jsou použitelné i u formy aktivní. Ovšem indikace vyšetření IGRA testu jako jediné metody k vyloučení TBC (aktivní i latentní formy) je nevhodná. Definitivní stanovení diagnózy TBC musí být v souladu s výsledky dalších metod a testů a s klinickým stavem pacienta [European Centre for Disease Prevention and Control, 2011].

1.7.2.1. QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube

Metoda QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube patří mezi metody IGRA. Varianta In-Tube (ve zkumavce) znamená, že krev pacienta je odebrána do tří zkumavek odběrové soupravy a v nich také probíhá inkubace. Tento test využívá ke stimulování T-lymfocytárních buněk v plně heparinizované krvi směsi peptidů simulujících mykobakteriální proteiny ESAT-6, CFP-10 a TB7.7 (p4). Specifický interferon gama je produkován Th1 buňkami jako reakce na stimulaci těmito peptidovými antigeny in vitro. Sérová koncentrace interferonu gama se detekuje pomocí testu ELISA. V testu

jsou používány speciální odběrové zkumavky, do kterých se odebírá 1 ml plné krve. Odběrové zkumavky se používají dvě nebo tři a jsou označeny NIL Control Tube, TB ANTIGEN Tube a případně i MITOGEN Tube. Zkumavka NIL Control Tube je použita jako negativní kontrola. Ve zkumavce TB ANTIGEN Tube jsou navázány specifické antigeny ESAT-6, CFP-10 a TB7.7 (p4). Zkumavka MITOGEN Tube se používá jako pozitivní kontrola pro každý testovaný vzorek, případně jako kontrola správného odběru vzorku, manipulace s ním a jeho správné inkubace. Na vnitřních stěnách zkumavek se nachází v lyofilizované podobě antigeny, proto je velmi důležité po náběru zkumavky s krví dobře promíchat otáčením zkumavek 8 až 10 krát. Při promíchání by krev měla pokrývat celé stěny zkumavek. Co nejdříve po odběru se zkumavky inkubují při 37 °C ve svislé poloze. Inkubaci je nutné zahájit nejdéle 16 hodin po odběru, inkubace trvá 16 až 24 hodin. Pokud se inkubace nezahájí ihned po náběru, je potřeba zopakovat promíchání krve těsně před inkubací stejným způsobem, jak již bylo zmíněno. Po ukončení inkubace zkumavek se oddělí plazma centrifugací. Zkumavky obsahují gelovou zátku, která oddělí buňky od plazmy a usnadní přenesení plazmy do mikrozkušavek. Vzorky plazmy se mohou skladovat až 8 týdnů při teplotě 2–8 °C, nebo při teplotě -20 °C či při teplotě nižší než -70 °C až po dobu 3 měsíců. Vzorky se poté zpracovávají metodou QuantiFERON®-TB Gold In-Tube ELISA, která mimo jiné obsahuje i lyofilizovaný standard interferonu gama. Přípravují se čtyři ředění standardů po dvojicích nebo trojicích, podle toho zda byla v testu použita i zkumavka MITOGEN Tube. Pokud je produkce interferonu gama jako odpověď na specifické antigeny ve zkumavce TB ANTIGEN Tube (plazma z TB Antigen Tube) podstatně vyšší než hodnota negativní kontroly (plazma z NIL Control Tube), považuje se výsledek za pozitivní. Odečítá se hladina interferonu gama v NIL Control Tube od hladiny v TB ANTIGEN Tube a MITOGEN Tube, pokud je tato použita. V případě, že se použije zkumavka MITOGEN Tube, slouží vzorek plazmy, který je v této zkumavce stimulovaný mitogenem, jako pozitivní kontrola pro každý testovaný vzorek. Pokud je nízká hodnota ve zkumavce MITOGEN Tube a zároveň i nízká hodnota ve zkumavce s TB antigeny znamená to, že výsledek nelze určit (indeterminate result). Tento případ může nastat například u imunokompromitovaných pacientů, kteří mají nedostatek Th1

buněk nebo jsou tyto buňky poškozeny nebo mají porušenou schopnost produkce interferonu gama. Zároveň může tato situace nastat při nesprávné manipulaci se vzorkem, především v preanalytické fázi. Zkumavka NIL Control Tube se používá k určení takzvaného nespecifického pozadí, neboli měření hladiny nespecifického interferonu gama ve vzorcích krve. Interferon gama je totiž produkován nejen Th1 buňkami a NK buňkami jako odpověď na specifické antigeny, ale bylo už zjištěno, že ho umí produkovat i další buňky, které nesou znaky CD4, CD8, pak také například buňky myeloidní, dendritické a další. Po zpracování testu metodou ELISA se měří optická denzita jamek v destičce a nejlépe pomocí QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube Analysis Software je sestavena standardní křivka a výsledky jsou vyhodnocovány pro každý testovaný vzorek. Regresní křivku lze sestavit i pomocí standardních tabulkových kalkulátorů nebo statistických softwarů jako je například Microsoft Excel. K interpretaci výsledků se odečítá hodnota naměřená ve zkumavce NIL od hodnoty TB ANTIGEN a hodnota ve zkumavce MITOGEN od hodnoty NIL. Pokud je hodnota TB ANTIGEN minus NIL menší než 0,35 IU/ml a při použití zkumavky MITOGEN je hodnota MITOGEN minus NIL větší nebo rovna 0,5 UI/ml, jedná se o negativní výsledek. Další možností negativního výsledku je pokud TB ANTIGEN minus NIL je větší nebo rovna než 0,35 IU/ml a menší než 25 % hodnoty NIL a zároveň MITOGEN minus NIL větší nebo rovna 0,5 UI/ml. Negativní výsledek znamená, že infekce způsobená *Mycobacterium tuberculosis* je nepravděpodobná. Pokud je hodnota TB ANTIGEN minus NIL větší nebo rovna 0,35 IU/ml a větší nebo rovna 25 % hodnoty NIL, hodnota MITOGEN minus NIL může být libovolná a hovoříme o pozitivním výsledku. Pozitivní výsledek znamená, že infekce *Mycobacterium tuberculosis* je pravděpodobná. Pokud je hodnota NIL vyšší než 8 IU/ml, je výsledek označen jako neurčený, protože odpověď na specifické TB antigeny potom bývá mimo měřitelný rozsah testu. Neurčený výsledek je vyhodnocen také, když hodnota TB ANTIGEN minus NIL je větší nebo rovna než 0,35 IU/ml a menší než 25 % hodnoty NIL a zároveň MITOGEN minus NIL menší než 0,5 UI/ml. Nebo pokud rozdíl mezi TB ANTIGENEM a NIL je menší než 0,35 UI/ml a mezi MITOGENEM a NIL zároveň

menší než 0,5 UI/ml [Bergamin a spol., 2009; Frieden a spol., 2010; Todd, 2006; Pai a spol. 2004; Pai a spol, 2008]. Interpretace výsledků je přehledně popsána v tabulce č. 1.

Nil (IU/ml)	TB-antigeny minus Nil (IU/ml)	Mitogen minus Nil (IU/ml)	Výsledek QuantiFERON®- TB Gold In-Tube	Interpretace
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	NEGATIVNÍ	Nepravděpodobná infekce <i>M. tuberculosis</i>
	≥ 0,35 a < 25 % hodnoty Nil	≥ 0,5		
	≥ 0,35 a ≥ 25 % hodnoty Nil	Libovolná hodnota	POZITIVNÍ	Infekce <i>M. tuberculosis</i> pravděpodobná
	< 0,35	< 0,5	NEURČITÝ	S ohledem na citlivost (senzitivitu) TB antigenů výsledek neurčen
≥ 0,35 a < 25% hodnoty Nil	< 0,5			
> 8,0	Libovolná hodnota	Libovolná hodnota		

Tabulka č. 1 [Příbalový leták QuantiFERON®-TB Gold In-Tube] upraveno

Nevýhodou metody QuantiFERON®-TB Gold In-Tube je právě výskyt neurčených výsledků. Není znám počet lymfocytů v reakci. V literatuře je popsáno 5 až 40 % neurčených výsledků u pacientů se sníženou imunitou nebo u pacientů vyššího věku. [Lalvani, 2010].



Obrázek č. 3: Odběrová souprava pro QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube [vlastní zdroj]

1.7.2.2. T-SPOT[®].TB test

Druhou metodou, řazenou mezi IGRA, ale podstatně méně ovlivněnou imunodeficiencí pacienta, je T-SPOT[®].TB test (Oxford Immunotec, Abingdon, United Kingdom). Je to imunologická metoda spotové analýzy ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot) určená k detekci aktivovaných T-lymfocytů, které po aktivaci antigeny *Mycobacterium tuberculosis* produkují interferon gama. Interferon gama se detekuje přímo u navázaného aktivovaného T-lymfocytu [Jung and others, 2012]

K provedení tohoto testu je potřeba 8 ml periferní krve odebrané do zkumavky s lithium heparinem (event. s citrátem sodným). Vzorky musí být zpracovány do 8 hodin po odběru. V laboratoři se z krve oddělí a promyjí periferní krevní mononukleární buňky a spočítají se. K testu je potřeba $2,5 \times 10^5$ životaschopných buněk na jednu jamku, pro provedení testu u jednoho pacienta se použijí 4 jamky. Spočítáním buněk a jejich následným ředěním se zajistí jejich standardní počet při provedení testu i u pacientů imunokompromitovaných s nízkým počtem T-lymfocytů. Na membráně každé ze 4 jamek v reakci jsou navázány protilátky proti interferonu gama. První jamka slouží jako negativní kontrola, ve druhé se k buňkám přidávají specifické antigeny ESAT 6, ve třetí specifické antigeny CFP10 a poslední jamka slouží jako pozitivní kontrola. K buňkám se přidává fytohemaglutinin. Interferon gama, který produkují T-lymfocyty senzibilizované antigeny, se během inkubace při teplotě 37 °C ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO₂ naváže na protilátky na membráně na dně jamky. Inkubace probíhá 16 až 20 hodin. Po inkubaci se jamky promyjí a přidá se konjugát, který obsahuje enzymem značenou protilátku. Ta se naváže na vzniklý komplex již navázaný na membráně. Po opětovném promytí a přidání substrátu, vznikne v místě jednotlivých aktivovaných T-lymfocytů produkujících interferon gama tmavý spot neboli otisk. Hodnotí se počet spotů v jednotlivých jamkách pomocí lupy, mikroskopu nebo speciální čtečky destiček ELISPOT.

V jamce negativní kontroly by neměly být žádné nebo jen několik spotů. Pokud je jich tam více než deset, je výsledek neurčitý a je nutné test zopakovat. Pozitivní kontrola by měla obsahovat minimálně dvacet spotů.

Výsledek testu se hodnotí jako pozitivní, pokud je počet spotů v jedné nebo druhé jamce se specifickými antigeny minus počet spotů v negativní kontrole větší nebo roven 6. Znamená to, že vzorek krve obsahuje T-lymfocyty, které reagují se specifickými antigeny *Mycobacterium tuberculosis*. Pokud je počet spotů menší než 5, je výsledek negativní a znamená to, že pravděpodobně neobsahuje T-lymfocyty, které by reagovali se specifickými antigeny *Mycobacterium tuberculosis*.

Senzitivita obou uvedených metod je velmi vysoká, závisí však na určitých faktorech: stupeň rizika nákazy *Mycobacterium tuberculosis*, známá expozice tuberkulóze, předchozí vakcinace BCG apod. (uváděná senzitivita 80-98 %) [Pai a spol., 2008].

1.7.2.3. Zařazení IGRA testů do standardních postupů

Potřeba odhalení latentní tuberkulózy u určitých skupin nemocných vedlo k zařazení IGRA testů do některých standardních postupů léčby těchto pacientů. Jedná se zejména o osoby, u kterých je nebo již byla nasazena tzv. biologická léčba.

Biologická léčba je jeden z moderních způsobů léčby autoimunitních onemocnění, někdy i onemocnění nádorových apod. Představuje naději pro pacienty, u kterých selhala léčba klasická. Jejím principem je terapie pomocí geneticky upravených proteinů. Biologické léky zpravidla blokují prozánětlivé cytokiny, jakými jsou tumor nekrotizující faktor TNF nebo interleukiny IL1 a IL-6 a některé další. Léky blokující TNF se používají především u revmatoidní artritidy a spondylartritid a vyznačují se schopností výrazně zpomalovat až zastavovat průběh onemocnění. Žádoucím účinkem této léčby je potlačení buněčné imunity organismu, ovšem to se může stát značně rizikovým faktorem při vzniku některých infekčních onemocnění, např. aktivace latentní tuberkulózy. Tato léčba je přísně indikována a sledována. V ČR je každý pacient podstupující léčbu blokující TNF registrovaný. Podle závazných doporučení lékařských odborných společností [ČRS, ČPFS, ČIS] je nezbytné provést před zahájením biologické léčby i vyšetření na vyloučení latentní tuberkulózy (QuantiFERON[®]-TB Gold nebo T-SPOT[®].TB, tuberkulínový test, rentgen plic, klinické vyšetření). Vyšetření IGRA by mělo být zopakováno po třech měsících léčby, pak i s rentgenem plic opět po roce.

Výsledky vyšetření by měly být konzultovány s pneumologem, který indikuje a vede léčbu antituberkulotiky. Jako profylaxe aktivace tuberkulózy se používá šestiměsíční podávání INH (isoniazidu) v dávce 5 mg/kg, maximálně 300 mg denně. V některých případech, pokud se nejedná o aktivní formu TBC, je možné zahájit anti TNF léčbu (biologickou léčbu) společně s terapií antituberkulotiky. Lépe je však začít s biologickou léčbou až s měsíčním odstupem. V případě aktivní formy TBC musí být léčba anti TNF přerušena až do ukončení léčby antituberkulotiky. Nasazení biologické léčby bez předchozího vyloučení latentní tuberkulózy může při vzplanutí aktivní infekce ohrozit pacienta na životě [ČRS, ČPFS, ČIS].

2. METODICKÁ ČÁST

Ve své práci se zabývám analýzou 1554 vzorků krve, které byly v období od 1. června 2011 do 30. června 2013 vyšetřeny metodou QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube v Laboratoři pro diagnostiku mykobakterií na Ústavu mikrobiologie ve Fakultní nemocnici v Plzni.

Vzorky pocházely z různých zdravotnických zařízení ambulantních i lůžkových, vyšetření bylo indikováno lékaři odbornosti Tuberkulóza a respirační nemoci, ale i odborností jiných. V práci bylo sledováno zastoupení jednotlivých typů těchto zdravotnických zařízení.

Vyšetřovaní pacienti byli analyzováni podle vybraných diagnóz (biologická léčba, zhoubné nádory plic, kultivační pozitivita *Mycobacterium tuberculosis*, osoby v kontaktu s aktivní tuberkulózou) a podle přítomnosti rizikových faktorů ve vztahu k nákaze tuberkulózou (abusus alkoholu resp. drog, výkon trestu, bezdomovectví).

Vzorky krve byly odebrány v uvedených zdravotnických zařízeních do odběrové soupravy pro QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube (Cellestis Carnegie Victoria, Australia). Odběr byl proveden podle doporučeného postupu výrobce setu. Každá odběrová souprava se skládá z 3 zkumavek - Nil Tube (NIL), používaná jako negativní kontrola, odlišena šedým víčkem, Antigen Tube (TB Ag) - na stěnách zkumavky jsou navázány specifické TB antigeny ESAT 6, CFP 10 a TB7.7, červené víčko a Mitogen Tube (MIT), použita jako pozitivní kontrola, fialové víčko. Zásobní zkumavky byly skladovány při teplotě 4–25 °C. Do každé ze zkumavek byl odebrán 1 ml krve (množství po rysku vyznačenou na zkumavce). Po odběru byly všechny zkumavky promíchány otočením 8-10x tak, aby odebraná krev pokryla stěny zkumavek. Do laboratoře byly zkumavky s odebranou krví transportovány do 8 hodin po odběru (lze až do 16 hodin) ve vertikální poloze.

V laboratoři bylo po kontrole identifikačních údajů zkontrolováno množství krve v odebraných zkumavkách. Byla-li zjištěna odchylka od doporučeného postupu pro odběr materiálu (malé nebo naopak nadměrné množství krve ve zkumavkách, nesprávný transport, nedodržení časových doporučení...), vyšetření nebylo provedeno a byl vyžádán nový odběr.

Časové údaje (datum a čas příjmu) byly zaznamenány na žádanku, po přidělení protokolového čísla byl proveden záznam do laboratorního informačního systému.

Vlastní vyšetření probíhalo ve třech fázích. V první fázi byly zkumavky ihned po dodání do laboratoře promíchány otočením 8 – 10x tak, aby se krev dostala do kontaktu se stěnami zkumavky. Pak byly uloženy ve stojánku k inkubaci v termostatu. Inkubace probíhala při 37 °C 16 až 20 hodin.

Ve druhé fázi vyšetření (druhý den, po inkubaci v termostatu) byly zkumavky centrifugovány 5 minut při 2500 RCF (g). Gelová zátka ve zkumavce oddělila krevní plasmu od krevních elementů (pokud k oddělení nedošlo, centrifugace byla opakována). Poté byla krevní plazma z každé zkumavky přenesena do zkumavky typu Eppendorf s přesným označením NIL, MIT, TB Ag. Takto upravená plazma byla uchována až do konečného zpracování v mrazicím boxu při -25 °C (max. 14 dní).

Třetí fáze (finální) představovala stanovení množství vytvořeného interferonu gama v krevní plasmě v jednotlivých zkumavkách (NIL, TB Ag a MIT) metodou ELISA. Stanovení bylo provedeno kitem QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA (Cellestis Carnegie Victoria, Australia).

Kit QuantiFERON[®]-TB Gold ELISA obsahuje tyto komponenty: 24 mikrotitračních stripů po 8 jamkách, které jsou potažené myší monoklonální protilátkou proti lidskému interferonu gama, lahvičku s lyofilizovaným lidským INF gama, který se používá jako standard a obsahuje rekombinantní IFN gama, bovinní kasein a 0,01 % Thimerosal, zelené rozpouštědlo (Green diluent), které obsahuje bovinní kasein, myší sérum, 0,01 % Thimerosal, konjugát obsahující 0,01% Thimerosal, protilátky proti lidskému interferonu gama značené křenovou peroxidázou, promývací

pufr koncentrovaný obsahující 0,01 % Thimerosal, dále roztok enzymového substrátu (Enzyme Substrat Solution) s peroxidem vodíku a stop roztok (Enzyme Stopping Solution) obsahující kyselinu sírovou. Kit uložený v chladničce při 2–8 °C je použitelný 3 roky od data výroby. Konjugát a enzymový substrát, které jsou součástí kitu, je třeba chránit před přímým slunečním zářením.

K provedení analýzy byly využity tyto přístroje: biohazardní box třídy II.A/ Clean air pro bezpečnou manipulaci se vzorky krve, komorový termostat udržující teplotu 37 °C, laboratorní centrifuga Hettich Rotina 46R nastavená na 1500-2500 RCF (g), třepačka Minishaker 2 neboli vortex s nastavitelnou rychlostí, třepačka na mikrodestičky Mikroshaker Dynatech (Brno, CZ), promývačka Columbus plus/TECAN a fotometr na mikrodestičky Dynatech s filtrem 450 nm a s referenčním filtrem nastaveným na 630 nm. Použité laboratorní pomůcky byly tyto: kalibrované pipety Finpipete s nastavitelným objemem pro objemy 10 až 1000 µl a se špičkami na jedno použití, multikanálová pipeta Eppendorf na 50 a 100 µl se špičkami na jedno použití, mikrozkušavky typu Eppendorf s víčkem pro uchovávání plazmy, odměrný válec, minutka na měření času. Také byla použita destilovaná voda a samozřejmě ochranný pracovní oděv včetně latexových rukavic pro práci s infekčním materiálem.

Před samotnou analýzou byly všechny reagenty z kitu, kromě koncentrovaného konjugátu, temperovány minimálně 60 minut při laboratorní teplotě (přibližně 22 °C). Zmražené krevní plazmy byly pozvolna rozmrazeny při laboratorní teplotě. V případě použití nového kitu, se přidalo k lyofylovanému interferon gama standardu množství destilované vody, jež je uvedené na lahvičce. Lehce se promíchalo tak, aby se zabránilo pění. Připravil se potřebný počet stripů, které se umístily do rámečku (na každého pacienta tři jamky vedle sebe a na každý standard také tři jamky vedle sebe). Standardy potřebné k vytvoření standardní křivky a určení cutt off hodnoty se ředily ve čtyřech koncentracích - doplněním standardu objemem vody uvedeným na lahvičce vznikne roztok interferonu gama o koncentraci 8,0 IU/ml, ten se použije k přípravě řady standardů. Do zkumavky standardu 1 se automatickou pipetou přidá 150 µl a do dalších tří po 210 µl zeleného ředícího roztoku. Do standardu 1 se poté ještě přidá 150 µl

roztoku interferonu gama o koncentraci 8,0 IU/ml. Po promíchání se z této zkumavky přenese 70 µl do zkumavky 2 a po opětovném promíchání se ze zkumavky 2 přenese opět 70 µl do zkumavky 3. Ve zkumavce standardu 4 zůstává jen zelený ředící roztok, takže nulová koncentrace interferonu gama. Ve zkumavkách 1 až 3 byly připraveny standardy o koncentracích 4,0 IU/ml, 1,0 IU/ml a 0,25 IU/ml. Standardy se připravují vždy čerstvé.

K lyofilizovanému 100x koncentrovanému konjugátu se pipetou přidalo 0,3 ml destilované vody. Je důležité, aby došlo k úplnému rozpuštění bez vzniku pěny. Na každé testování je připravován čerstvý takzvaný pracovní roztok. Ten je ředěn podle počtu použitých stripů z koncentrovaného konjugátu a zeleného ředícího roztoku. Na 3 stripy je použito 15 µl konjugátu a 1,5 ml zeleného ředícího roztoku. Pracovní roztok nesmí být připraven déle než 6 hodin předem. Nepoužitý koncentrovaný konjugát je poté uložen zpět do chladničky (2 až 8 °C).

Seřazení vzorků plazmy do mikrotitrační destičky bylo dle doporučení výrobce v pořadí: NIL, TB-Ag, MIT. Vzorky byly za pomoci laboratorní třepačky vortex promíchány, aby došlo k rovnoměrnému rozložení interferonu gama ve vzorku. Multikanálovou pipetou bylo přidáno 50 µl čerstvě připraveného pracovního roztoku konjugátu do jamek ELISA destičky. Automatickou pipetou bylo dále přidáváno 50 µl testovaných vzorků plazmy do příslušných jamek. První byla přidávána plazma ze zkumavky NIL Tube, pak plazma stimulovaná specifickými TB antigeny a do třetí jamky kontrolní plazma s mitogenem. Pacientské vzorky se přidávaly zleva od páté jamky v prvním stripu, aby bylo ponecháno místo na standardy. Standardy byly po promíchání přidávány do destičky až po přidání všech vzorků v množství 50 µl do třech jamek vedle sebe v pořadí od nejvyšší koncentrace k nulové.

Na třepačce pro mikrodestičky byla takto připravená destička důkladně promíchána po dobu 1 minuty. Poté byla přikryta víčkem a inkubována ve tmě při laboratorní teplotě (22 ± 5 °C) po dobu 120 (± 5) minut. Inkubace probíhala ve tmě, protože destičky nesmějí být během inkubace vystaveny přímému slunečnímu světlu.

V průběhu inkubace byl připraven promývací roztok přidáním 1 dílu 20x koncentrovaného promývacího pufru a 19 dílů destilované vody, byl důkladně promíchán. Promývací roztok se připravuje opět podle počtu použitých stripů. Na promytí destičky se všemi stripy je potřeba přibližně 2 litry pracovního roztoku pufru.

Těsně před ukončením inkubace se připravila automatická promývačka (příprava promytím nejdříve destilovanou vodou a potom připraveným promývacím roztokem). Pak byla vložena do promývačky destička a spuštěn program, ve kterém byla každá jamka promyta šestkrát 400 µl pracovního roztoku pufru. Automatická promývačka byla nastavena tak, aby každá jamka byla naplněna promývacím pufrem až po okraj a aby pauza mezi každým cyklem promývání nebyla kratší než 5 sekund. Pufr byl tedy v jamce ponechán alespoň 5 sekund, potom teprve byl odsátý do nádoby na odpad s dezinfekčním přípravkem.

Po promytí byla destička otočena dnem vzhůru a opakovaným klepnutím na vrstvu buničité vaty byly odstraněny zbytky promývacího pufru. Následně bylo do všech jamek multikanálovou pipetou přidáno 100 µl enzymového substrátu. Enzymový substrát je třeba chránit před světlem. To znamená, že by lahvička neměla být příliš dlouho otevřena nebo by substrát neměl být připraven v pipetovací vaničce delší dobu. Po přidání enzymového substrátu byl obsah destičky dobře promíchán na třepačce pro mikrodestičky. Destička byla přikryta víčkem a inkubována opět ve tmě při laboratorní teplotě 30 minut. Po uplynutí této doby bylo do každé jamky přidáno 50 µl stop roztoku, který obsahuje kyselinu sírovou. Stop roztok byl pipetován do jamek ve stejném pořadí a přibližně stejnou rychlostí jako enzymový substrát. Obsah destičky byl opět promíchán pomocí třepačky na mikrodestičky.

Do pěti minut od přidání stop roztoku byla změřena optická denzita všech jamek v destičce fotometrem (Dynatech, Brno, CZ) s filtrem 450 nm a s referenčním filtrem nastaveným na 630 nm (viz Příloha č. 1)

Získané hodnoty byly vytištěny a zároveň uloženy v souboru. Soubor dat byl vyhodnocen analyzačním softwarem QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube Analysis Software, který je dodáván firmou Cellestis. Software sestavením standardní křivky z naměřených hodnot standardů provede kontrolu kvality testu a stanoví množství interferonu gama v každém vzorku (IU/ml) (viz Příloha č. 2), zároveň vyhodnotí celkové výsledky pro každého pacienta (viz Příloha č. 3). Validita testu ELISA závisí na správném zpracování standardů. Průměrná hodnota optické denzity standardu 1 musí být $\geq 0,600$, standardu 1 a 2 musí být v intervalu $\pm 15 \%$ vzhledem k průměrným hodnotám optické denzity pro 1 a 2 (% variačního koeficientu (CV) $\leq 15 \%$). Dále hodnoty optických denzit ve trojicích standardů 3 a 4 se nesmí lišit od průměrných hodnot pro 3 a 4 o více než 0,04. Takzvaný korelační koeficient (r), který se vypočítává z průměrných hodnot optických denzit standardů, musí být $\geq 0,98$. A také průměrná hodnota optické denzity nulového standardu 4 by měla být $\leq 0,150$. Pokud kritéria kvality testu nejsou splněna, je testování vyhodnoceno jako nevalidní a vyšetření je nutné zopakovat, výsledky nelze interpretovat.

Výsledky byly vyhodnoceny dle kritérií uvedených v tabulce (Tabulka č. 1), což je standardizovaná metoda interpretace. Výsledky byly vyhodnoceny jako pozitivní, negativní nebo neurčené (indeterminate).

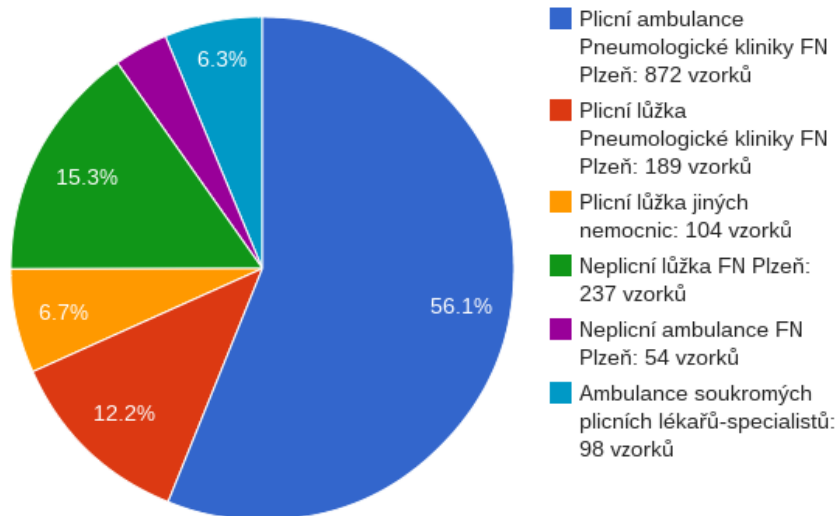
Výsledky byly validovány lékařem - klinickým mikrobiologem a byly odeslány indikujícímu lékaři. Konečnou interpretaci výsledku ve vztahu ke konkrétnímu pacientovi prováděl klinický lékař, v komplikovaných případech po konzultaci s mikrobiologem.

3. VÝSLEDKY

V testovaném souboru byl kromě vlastního hodnocení metody QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube sledován i původ jednotlivých vzorků (viz Graf č. 1). Nejvíce zastoupeny byly odběry z plicních oddělení, a to především z Pneumologické kliniky ve FN Plzeň, se kterou laboratoř úzce spolupracuje.

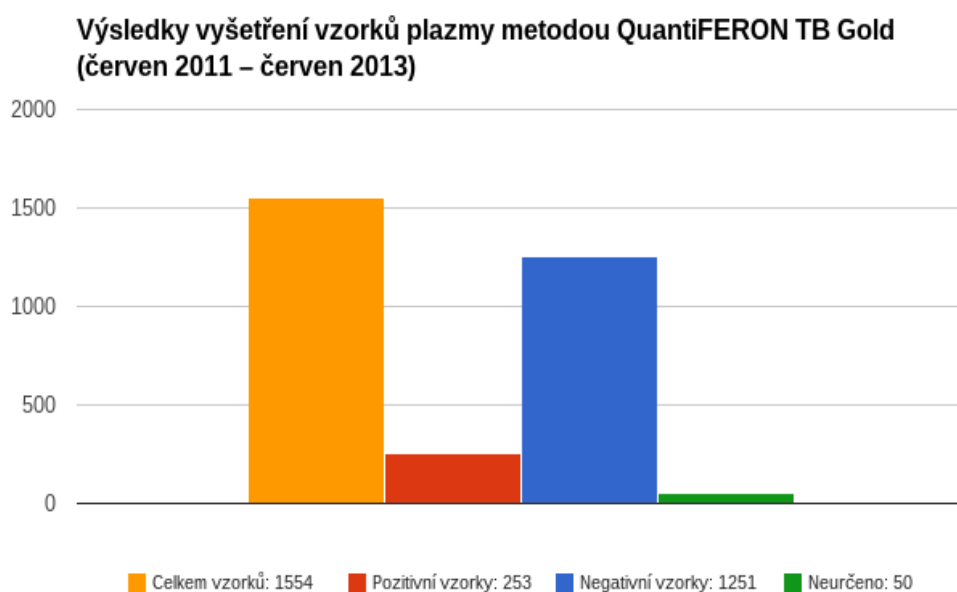
Graf č. 1: Původ vzorků podle zdravotnických zařízení.

Původ vzorků podle zdravotnických zařízení



Přehled výsledků: 1554 vzorků vyšetřených v období období od června 2011 do června 2013 je uveden v grafu č. 2 – Výsledky vyšetření vzorků plazmy metodou QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube (červen 2011 – červen 2013).

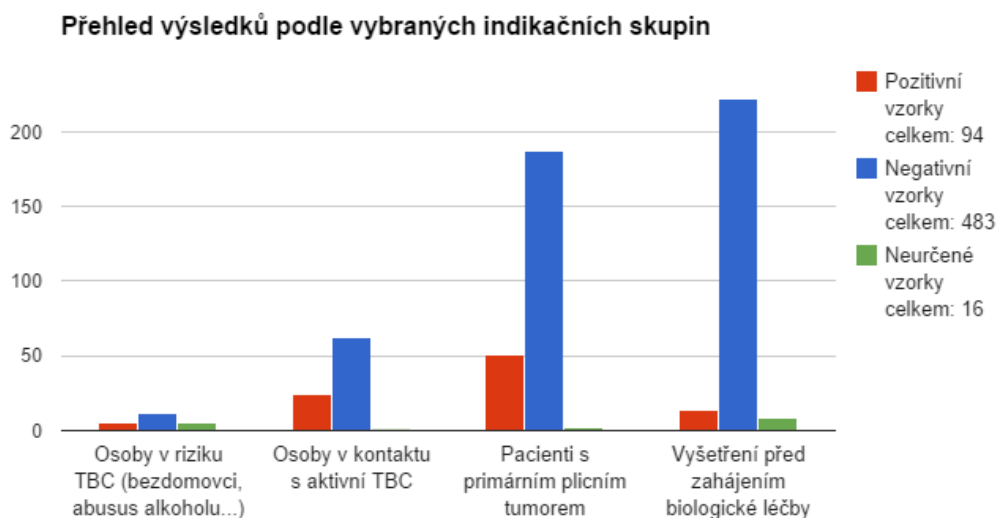
Graf č. 2 - Výsledky vyšetření vzorků plazmy metodou QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube (červen 2011 – červen 2013).



Tabulka č. 2: Přehled výsledků u vybraných indikačních skupin.

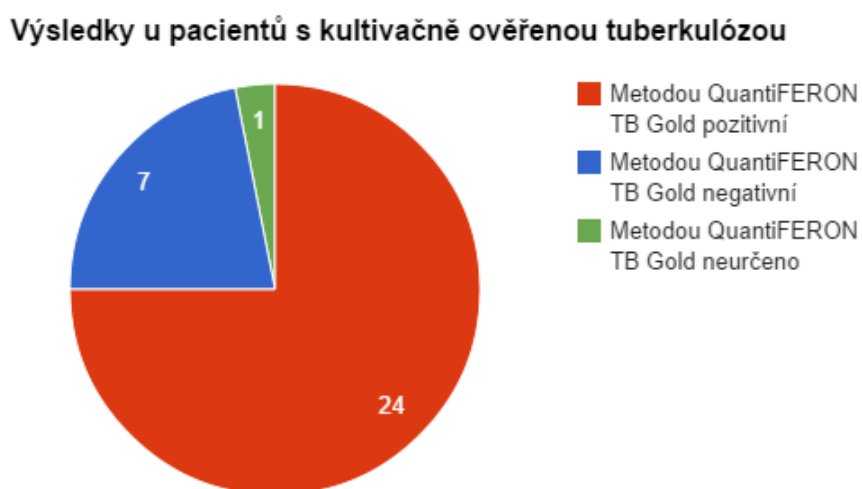
Výsledky u vybraných skupin	Pozitivní	Negativní	Neurčené	Celkem
Riziková skupina (alkohol, bezdomovci...)	5	12	5	22
Kontakt s aktivní tuberkulózou	24	62	1	87
Primární plicní tumor	51	187	2	240
Před zahájením biologické léčby	14	222	8	244
Kultivační pozitivita <i>M. tuberculosis</i>	24	7	1	32

Graf č. 3: Přehled výsledků podle vybraných indikačních skupin.



U osob s kultivačně ověřenou tuberkulózou (tedy s kultivační pozitivitou *M. tuberculosis*), celkem 32 případy, byly metodou QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube (červen 2011 – červen 2013) prokázány výsledky pozitivní (24 případů), negativní (7 případů) a neurčené (1 případ) – viz graf č. 4

Graf č. 4: Výsledky u pacientů s kultivačně ověřenou tuberkulózou.



4. DISKUZE

V obraně organismu proti infekčnímu onemocnění způsobenému acidorezistentní tyčinkou *Mycobacterium tuberculosis* se uplatňuje především buněčná imunita. Protilátková odpověď hraje mnohem menší roli. Proto je nepřímá diagnostika této nemoci svým způsobem omezená, průkaz protilátek je metoda k diagnostice tuberkulózy nevhodná, její výsledky mohou být zavádějící. Podle WHO je vyšetřování protilátek proti tuberkulóze nevhodné a může vést ke stanovení nesprávné diagnózy [Glenn, 2011].

Z tohoto důvodu byly vyvinuty metody označované IGRA, které jsou schopny detekovat buněčnou imunitní odpověď na přítomnost antigenů této bakterie v organismu. Tyto metody jsou používány jako alternativa k imunodiagnostickému tuberkulínovému testu, přičemž mají oproti němu mnoho výhod. Především jde o fakt, že u IGRA metod je vyloučena zkřížená reakce s antigeny *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) a s dalšími netuberkulózními mykobakteriemi (s výjimkou *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium szulgai* a *Mycobacterium marinum*). Tyto metody jsou při správném provedení a interpretaci testu specifičtější a citlivější než TST (tuberkulínový kožní test), hlavně u latentní tuberkulózy. Výhodný je také fakt, že stačí jen jedna návštěva pacienta (odběr krve), zatímco u TST jsou nutné návštěvy dvě (aplikace a odečet výsledku testu) a odečet výsledku je subjektivní [Yilmaz a spol., 2012; Çaglayan a spol., 2011; Franken a spol., 2007]. Podle klinických studií nedochází ke snížení nebo zvýšení odpovědi na TB-specifické antigeny při použití IGRA metod provedených po aplikaci tuberkulínového testu. [Nayak, 2012].

Cílem této práce bylo objasnit princip těchto metod (QuantiFERON[®]-TB Gold a T-SPOT[®].TB) a zhodnotit výsledky vyšetření daného souboru vzorků. Obě tyto metody jsou založené na stejném principu, ale využívají různý způsob hodnocení produkce interferonu gama senzibilizovanými T-lymfocyty. QuantiFERON[®]-TB Gold měří

hladinu interferonu gama v krevní plazmě metodou ELISA, v reakci je neznámé množství lymfocytů. T-SPOT[®].TB izoluje T-lymfocyty z plné krve a po jejich inkubaci s tuberkulózními antigeny se odečítá přímo počet aktivovaných lymfocytů metodou ELISPOT. Zde se pracuje se standardizovaným množstvím T-lymfocytů.

Oba testy byly vydány ke komerčnímu použití licencí se stanovením ELISPOT jako T-SPOT[™]-TB (Oxford Immunotec, Abingdon, UK) a ELISA QuantiFERON[™]-TB Gold In-Tube (Cellestis, Carnegie, Austrálie) [Lalvani a spol., 2010].

Soubor klinických vzorků byl hodnocen z hlediska indikujícího zdravotnického zařízení a lékařské odbornosti. Převážná většina vzorků pocházela z oddělení odbornosti tuberkulóza a respirační nemoci (TRN) - 1263 vzorků, tj. 81,3 %, což koresponduje s faktem, že léčba tuberkulózy je vyhrazena právě této lékařské odbornosti [Zatloukal a Kos, 2013]. Z těchto oddělení byly nejvíce zastoupeny ambulance - 970 vzorků, tj. 62,4 % z celkového počtu všech vzorků. Plicní ambulance pracují také jako dispenzarizační střediska pacientů po prodělaném tuberkulózním onemocnění, zabezpečují epidemiologická šetření (vyhledávání kontaktů s aktivní tuberkúzou apod.) a spolupracují s ostatními lékařskými odbornostmi v rámci konziliární služby. Proto je zde toto vyšetření využíváno velmi často. Nejméně vzorků bylo dodáno z jiných oddělení než TRN, a to ještě většinou po konzultaci a doporučení právě odborníka TRN (291, tj. 18,7 %).

Sledovaný soubor vzorků byl vyšetřen pouze metodou QuantiFERON[®]-TB Gold. Metoda T-SPOT[®].TB se na našem pracovišti teprve zavádí a vyšetřených vzorků je zatím malé množství.

V souboru 1554 vyšetřovaných vzorků bylo 253 (16,3 %) vyhodnoceno jako pozitivní, 1251 (80,5 %) jako negativní a 50 (3,2 %) vzorků bylo neurčených (indeterminate). Neurčené výsledky mohou nastat z několika důvodů. Prvním z nich je pochybení v odběru a manipulaci se zkumavkami po odběru, tj. nedostatečné promíchání obsahu zkumavek, dále nedodržení časového intervalu mezi odběrem a začátkem inkubace nebo nedodržení teplotního rozsahu 22+/-5 °C (oboje nejčastěji při

chybném transportu do laboratoře). Proto je nezbytné dobře poučit odebírající personál o správném postupu. V těchto případech se doporučuje opakování vyšetření. Jestliže nelze jednoznačný výsledek určit ani po zopakování odběru, může být na vině zvýšení hladiny vnitřního interferonu gama v organismu či přítomnost heterofilních nespecifických protilátek v krvi pacienta. Dále mohou neurčené výsledky signalizovat nedostatečnou imunitní odpověď – nejčastěji malý počet T-lymfocytů v krvi nebo jejich omezená aktivita. S tím se setkáváme u pacientů se sníženou imunitou při různých onemocněních (HIV, pacienti po transplantacích, nemocní s imunosupresivní léčbou např. kortikoidy apod.) [Pai, 2008] V různých klinických studiích se neurčené výsledky pohybují mezi 5-40 % [Cho a spol., 2012; Lalvani a spol., 2010], což je více než v této práci.

Zajímavé je rozložení pozitivních, negativních a neurčených výsledků v jednotlivých sledovaných skupinách. Ve skupině osob s vysokým rizikem tuberkulózy (celkem 22 osob), což jsou bezdomovci, alkoholici, uživatelé drog a lidé spadající do kategorie casus socialis, byl poměr těchto výsledků poměrně vyrovnaný – pozitivní 5 (22,8 %), negativní 12 (54,4 %), neurčené 5 (22,8 %). Dá se předpokládat, že u mnoha z nich je přítomna tuberkulóza latentní, někdy i aktivní (vyšší procento pozitivity proti celému souboru). Více neurčených výsledků odráží špatný imunitní stav těchto osob [Narasimhan a spol., 2013].

U osob vyšetřovaných pro kontakt s bakteriologicky ověřenou tuberkulózou, tedy s pacientem s otevřenou formou nemoci (celkem 87 osob), byl vyšší podíl pozitivních výsledků IGRA – 24 (27,6 %). Nebyl zaznamenán ani jeden výsledek neurčený. Dá se předpokládat, že se víceméně jedná o zdravou skupinu osob s dostatečně fungujícím imunitním systémem. Prokázání latentní tuberkulózy u osob v kontaktu většinou vede k nasazení profylaktické léčby isoniazidem na dobu 6 měsíců. O léčbě rozhoduje pneumolog. Tím se zabrání přechodu do aktivní formy tuberkulózního onemocnění. Výsledky jsou porovnány se studií Fujikawa et al., kde byl počet pozitivních výsledků u vyšetřovaných kontaktů nižší (14,7 %). Rozdíl může být dán rozdílností kritérií pro indikaci vyšetření pacienta jako kontaktu s tuberkulózou [Fujikawa a spol., 2013].

Z výsledků vyplývá, že pro tuto skupinu jsou diagnostické IGRA metody velmi přínosné.

Další sledovanou skupinou byli pacienti, u kterých byl prokázán primární tumor plic různého typu (celkem 240 pacientů). Tito pacienti byli vyšetřeni IGRA metodou podle možnosti pneumologického oddělení co nejdříve po stanovení diagnózy, nešlo tedy o onkologické pacienty v posledním stádiu onemocnění. Z tohoto důvodu nebyl v této skupině žádný neurčený výsledek (imunita byla pravděpodobně ještě na dobré úrovni). Množství pozitivních výsledků je vyšší než průměr celého souboru (51, tj. 21,2 %). Tato skutečnost odpovídá tezi, že vznik plicního nádoru (zejména typu adenokarcinomu) může souviset s přítomností tuberkulózního ložiska v plicích. Naopak k rozvoji aktivní formy tuberkulózy může dojít z latentního ložiska v místě karcinomu anebo vlivem oslabení organismu nádorem [Karnak a spol., 2002; Shiels a spol., 2011].

Další, pravděpodobně nejvýznamnější, sledovanou skupinou byli pacienti, u nichž bylo vyšetření IGRA metodou použito jako screeningové vyšetření před anebo v průběhu biologické léčby (celkem 244). Principem biologické léčby je terapie pomocí geneticky upravených proteinů, léků, které blokují prozánětlivé cytokiny (tumor nekrotizující faktor nebo interleukiny). Tyto léky sice výrazně zpomalují, mnohdy až zastavují, autoimunitní onemocnění, ale jedním z jejich hlavních vedlejších účinků je možná aktivace latentní tuberkulózy. Pozastavením produkce cytokinů se postupně začnou rozpadat opouzdřené a kalcifikované tuberkulózní granulomy a začne docházet ke generalizaci infekce způsobené *Mycobacterium tuberculosis*. Rozvinutí aktivní tuberkulózy v průběhu této léčby může mít až fatální následky [Pavelka, 2005; Vencovský a spol., 2009; Lalvani a spol., 2008]. Vyšetření IGRA metodou před zahájením této léčby se stalo již součástí standardních postupů jednotlivých lékařských odborností, které jsou oprávněny tuto léčbu aplikovat. Tyto standardní postupy jsou vydávány odbornými společnostmi České lékařské společnosti J. E. Purkyně. Jde např. o Českou revmatologickou společnost (u pacientů s revmatoidní artritidou, Bechtěrovovou nemocí, psoriatickou artritidou apod.), Českou pneumologickou a ftizeologickou společnost (z titulu léčby tuberkulózních pacientů a odborného dohledu

nad tuberkulózou), Českou internistickou společností (léčbu onemocnění IBD – idiopatických střevních zánětů), apod. [ČRS, ČPFS, ČIS]. Většina výsledků IGRA v této skupině byla hodnocena jako negativní (222, tj. 91 %), což je pravděpodobně dáno skutečností, že těmito nemocemi jsou postiženi lidé mladší, u kterých je obecně výskyt tuberkulózy v ČR nižší [ÚZIS, 2012]. Neurčených výsledků bylo 8 (3,3 %), toto dokazuje určitý imunologický deficit této skupiny. Pozitivní výsledky (14, tj. 5,7 %) znamenají pro tuto skupinu nemocných závažný nález, protože jim nesmí být biologická léčba aplikována bez eliminace ložiska latentní tuberkulózy, což se většinou řeší nasazením chemoprolaxe isoniazidem a sledováním zdravotního stavu nemocného [Lalvani a spol., 2008].

Poslední skupinou, která byla v této práci sledována, je skupina pacientů, u kterých byla kultivačně potvrzena nákaza *Mycobacterium tuberculosis*, tedy u pacientů s prokázanou aktivní formou nemoci. V této relativně malé části sledovaného souboru (celkem 32 pacientů) byly vyhodnoceny vzorky pozitivní (24, tj. 75 %), jak by se dalo předpokládat, ale i vzorky negativní (7, tj. 21,9 %) a neurčené (1, tj. 3,1 %). Negativita IGRA metody u aktivní tuberkulózy může být způsobena aktivací buněčné imunitní obrany organismu, kdy T buňky a makrofágy migrují k místu působení infekčního agens (nejčastěji do plic) a vzájemně se ovlivňují sekrecí cytokinů. Aktivací imunitních procesů v místě infekce dochází k poklesu senzibilizovaných T-lymfocytů a hladiny interferonu přítomných v krvi. Dalším možným důvodem falešně negativního výsledku může být časné stádium infekce, kdy ještě nedošlo k rozvoji buněčné imunitní odpovědi. Tyto výsledky potvrzují, že negativní výsledek IGRA nevylučuje onemocnění tuberkulózou. Pokud jsou u pacienta nalezeny jiné známky tuberkulózního onemocnění, je nutné diagnózu ověřit dalšími postupy. I další odborné studie potvrzují výskyt falešně negativních výsledků IGRA u pacientů s aktivní tuberkulózou, např. Kiwon et al. - 52.3 % pozitivních výsledků, 36.4 % negativních a 11.4 % neurčených [Cho a spol., 2012], Miranda 25 % falešně negativních výsledků [Miranda a spol., 2010].

Specifita a senzitivita testu QuantiFERON[®]-TB Gold in Tube se pohybuje v širším rozmezí podle typu studie a podle typu vyšetřovaného souboru. Zhruba se pohybuje v hodnotách 89 % u případů aktivní tuberkulózy. Senzitivita testu u latentní formy onemocnění tuberkulózou nemůže být jednoznačně určena, jelikož právě u latentní formy neexistuje jednoznačný standard (u aktivní formy je markrem pozitivní kultivace *Mycobacterium tuberculosis* z pacientova sputa či jiného biologického materiálu). Může však být vyšší, a to z důvodu až 25% výskytu snížené imunitní odpovědi na TB-specifické antigeny u pacientů s aktivní formou tuberkulózy [Miranda a spol., 2010]. Specifita tohoto testu bývá uváděna větší než 98 - 99 %. Je tomu tak proto, že se homology antigenů ESAT 6 a CFP10 nacházejí i u netuberkulózních mykobakterií, jakými jsou *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum* či *Mycobacterium szulgai*, výsledek tak může být falešně pozitivní. [Miranda a spol., 2010].

Výsledky této bakalářské práce potvrdily pozitivní význam metody QuantiFERON[®]-TB Gold in Tube v diagnostice tuberkulózy latentní i aktivní. Pozitivní výsledek testu znamená, že přítomnost *Mycobacterium tuberculosis* v organismu je jen pravděpodobná a negativní výsledku znamená, že přítomnost této bakterie v organismu pravděpodobná není. Proto je nutné metody IGRA považovat za doplňující diagnostické postupy ke komplexní ucelené diagnostice tuberkulózního procesu. [CONTROL ECDC, 2011].

5. Seznam informačních zdrojů

AL-ORAINY, I. O., TIMMERMANS, J. F., PRINS, C., SLOOTMAN, E. J. H. J., DREVERMAN, J., BRUINS, H., VAN DISSEL, J. T. a AREND, S. M. *Diagnosis of latent tuberculosis: Can we do better?*. *Annals of Thoracic Medicine*. 2009, vol. 4, issue 1, s. 5-. DOI: 10.4103/1817-1737.44778. Dostupné z: <<http://www.thoracicmedicine.org/text.asp?2009/4/1/5/44778>>

AMERICAN LUNG ASSOCIATION. *Tuberculosis*. Dostupné z: <<http://www.lung.org/lung-disease/tuberculosis/>>.

BENEŠ, J.. *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. 651 s. ISBN 978-80-7262-644-1.

BERAN, J., HAVLÍK, J. *Lexikon očkování*. Praha: Maxdorf, 2008, 352 s. ISBN 978-807-3451-646.

BERAN, J., HAVLÍK, J., VONKA, V. *Očkování-minulost, přítomnost, budoucnost*. 1.vyd. Praha: Galén, 2005. 348 s. ISBN 80-726-2361-3.

BERGAMINI, B. M., M. LOSI, F. VAIENTI, R. D'AMICO, B. MECCUGNI, M. MEACCI, D. DE GIOVANNI, F. RUMPIANESI, L. M. FABBRI, F. BALLI a L. RICHELDI. *Performance of Commercial Blood Tests for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in Children and Adolescents*. *PEDIATRICS*. 2009-03-02, vol. 123, issue 3, e419-e424. DOI: 10.1542/peds.2008-1722. Dostupné z: <<http://pediatrics.aappublications.org/content/123/3/e419.full.html>>.

ÇAĞLAYAN, V., AK, Ö., DABAK, G., DAMADOĞLU, E., KETENCİ, B., ÖZDEMİR, M., ÖZER, S. and SAYGI, A. *Comparison of tuberculin skin testing and QuantiFERON-TB Gold-In Tube test in health care workers*. *Tuberkuloz ve Toraks*. 2011, vol. 59, issue 1, s. 43-47. DOI: 10.5578/tt.1129. Dostupné z: <<http://www.tuberktoraks.org/linkout.aspx?pmid=21554229>>.

CATTAMANCHI, A., SMITH, R., STEINGART, K. R., METCALFE, J. Z., DATE, A., COLEMAN, C., MARSTON, B. J., HUANG, L., HOPEWELL, P. C. a PAI, M.. *Interferon-Gamma Release Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in HIV-Infected Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2011, vol. 56, issue 3, s. 230-238. DOI: 10.1097/QAI.0b013e31820b07ab. Dostupné z: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>>.

ČESKÁ INTERNISTICKÁ SPOLEČNOST (ČIS) České lékařské společnosti J. E. Purkyně. *Guidelines - Biologická terapie idiopatických střevních zánětů*. Dostupné z: <<http://wp.interna-cz.eu/guidelines/gastroenterologie/>>

ČESKÁ PNEUMOLOGICKÁ A FTIZEOLOGICKÁ SPOLEČNOST (ČPFS) České lékařské společnosti J. E. Purkyně. *Doporučení Sekce pro tuberkulózu při ČPFS pro biologickou léčbu preparáty blokujícími účinek TNF α* . Dostupné z: <<http://www.pneumologie.cz/guidelines/>>

ČESKÁ REVMATOLOGICKÁ SPOLEČNOST (ČRS) České lékařské společnosti J. E. Purkyně. *Doporučení ČRS pro monitorování bezpečnosti biologické léčby*. Dostupné z <<http://www.revmatologicka-spolecnost.cz/doporucene-postupy-crs>>

DOCTORS WITHOUT BORDERS. *Tuberculosis*. Dostupné

z: <<http://www.doctorswithoutborders.org/our-work/medical-issues/tuberculosis>>.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. *Use of interferon-gamma release assays in support of TB diagnosis: ad hoc scientific panel opinion*. Stockholm: ECDC, 2011. ISBN 978-929-1932-405.

FRANKEN, W. P. J., J. F. TIMMERMANS, C. PRINS, E. J. H. J. SLOOTMAN, J. DREVERMAN, H. BRUINS, J. T. VAN DISSEL a S. M. AREND. *Comparison of Mantoux and QuantiFERON TB Gold Tests for Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in Army Personnel*. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2007-04-05, vol. 14, issue 4, s. 477-480. DOI: 10.1128/CVI.00463-06. Dostupné

z: <<http://cdli.asm.org/cgi/doi/10.1128/CVI.00463-06>>.

FRIEDEN, T.R. and others. *Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect Mycobacterium tuberculosis Infection — United States, 2010*, Centers for Disease Control and Prevention 2010. Dostupné

z: <<http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/rr/rr5905.pdf>>.

FUJIKAWA, A., FUJII, T., MIMURA, S., TAKAHASHI, R., SAKAI, M., SUZUKI, S., KYOTO, Y., UWABE, Y., MAEDA, S., MORI, T. and WILKINSON, J. R.. *Tuberculosis Contact Investigation Using Interferon-Gamma Release Assay with Chest X-Ray and Computed Tomography: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *PLoS ONE*. 2014-1-14, vol. 9, issue 1, e85612-. DOI: 10.1371/journal.pone.0085612.

Dostupné z: < <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0085612>>.

GLENN, T.. *WHO warns against the use of inaccurate blood tests for active tuberculosis*. A substandard test with unreliable results. 2011. Dostupné

z: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2011/tb_20110720/en/>.

HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J.. *Základy imunologie*. 2. vyd. Praha: Triton, c2001, 260 s. ISBN 80-725-4215-X.

CHO, K., CHO, E., KWON, S., IM, S., SOHN, I., SONG, S., KIM, H. a KIM, S.. Factors Associated with Indeterminate and False Negative Results of QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test in Active Tuberculosis. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. 2012, vol. 72, issue 5, s. 416-. DOI: 10.4046/trd.2012.72.5.416. Dostupné z: <<http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4046/trd.2012.72.5.416>>.

JIREŠ, J.. *Albertinum: boj proti tuberkulóze a jiným nemocem*. 1. vyd. Hradec Králové: Žamberk: ECC servis; Odborný léčebný ústav Albertinum, 2005. 111s. ISBN 80-86857-03-4.

JUNG, Y. J., J. LYU, B. YOO, C-K. LEE, Y-G. KIM, S-K. YANG, J-S. BYEON, K. J. KIM, B. D. YE, K-H. LEE, S-D. LEE, W. S. KIM, D. S. KIM a T. S. SHIM. *Combined use of a TST and the T-SPOT®.TB assay for latent tuberculosis infection diagnosis before anti-TNF- α treatment*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2012-10-01, vol. 16, issue 10, s. 1300-1306. DOI: 10.5588/ijtld.12.0004. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22863375>>.

KARNAK, D., KAYCAN, O., BEDER, S.. *Reactivation of pulmonary tuberculosis in malignancy*. *Tumori*. 2002 May-Jun;88(3):251-4. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12195766>>.

KAUFMANN, S.H.E., VAN HELDEN, P.. *Handbook of Tuberculosis: Clinics, diagnostics, therapy and epidemiology*. Hardcover, 2008, 311 Pages. ISBN 978-3-527-31888-9.

KŘEPELA, K.. *Tuberkulóza dětí a dorostu a její diferenciální diagnostika*. Praha: MAXDORF-JESSENIUS, c1995, 223 s. Malá monografie. ISBN 80-859-1203-1.

LALVANI, A. a PAREEK, M.. Interferon gamma release assays: principles and practice. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2010, vol. 28, issue 4, s. 245-252. DOI: 10.1016/j.eimc.2009.05.012. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X09003905>>.

LALVANI, A., MILLINGTON, K. A., PRINS, C., SLOOTMAN, H. J., DREVERMAN, J., BRUINS, H., VAN DISSEL, J. T. a AREND, S. M.. *Screening for tuberculosis infection prior to initiation of anti-TNF therapy: Can we do better?*. *Autoimmunity Reviews*. 2008, vol. 8, issue 2, s. 147-152. DOI: 10.1016/j.autrev.2008.07.011. Dostupné z: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568997208001237>>.

MACELA, A.. *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*. 1. vyd. Praha: Grada, c2006, 215 s. Malá monografie. ISBN 80-247-0664-4.

MIRANDA, C., TOMFORD, J. W., GORDON, S. M.. *Interferon-gamma-release assays: Better than tuberculin skin testing?*. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*. 2010-09-01, vol. 77, issue 9, s. 606-611. DOI: 10.3949/ccjm.77a.09112. Dostupné

NARASIMHAN, P., WOOD, J., MACINTYRE, CH. R., MATHAI, D., DATE, A., COLEMAN, C., MARSTON, B. J., HUANG, L., HOPEWELL, P. C. and PAI, M.. *Risk Factors for Tuberculosis: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Pulmonary Medicine*. 2013, vol. 2013, issue 3, s. 1-11. DOI: 10.1155/2013/828939. Dostupné z: <<http://www.hindawi.com/journals/pm/2013/828939/>>.

NAYAK, S. a ACHARJYA, B. *Mantoux test and its interpretation*. *Indian Dermatology Online Journal*. 2012, vol. 3, issue 1, s. 2-. DOI: 10.4103/2229-5178.93479. Dostupné z: <<http://www.idoj.in/text.asp?2012/3/1/2/93479>>.

PAI, M., RILEY, L. W., COLFORD, J. M.. *Interferon- γ assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review*. *The Lancet Infectious Diseases*. 2004, vol. 4, issue

12, s. 761-776. DOI: 10.1016/S1473-3099(04)01206-X. Dostupné

z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2951987/>>.

PAI, M., ZWERLING A., MENZIES D. *Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update*. *Ann Intern Med*. 2008 Aug 5;149(3):177-84. Epub 2008 Jun 30. Dostupné
z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18593687>>.

PAVELKA, K., *Biologická léčba revmatoidní artritidy a dalších revmatických onemocnění*. *Remedia* 2005;15:53–66.

ROTHSCHILD, B. M., MARTIN, L. D, LEV, G., BERCOVIER, H., BAR-GAL, G. K., GREENBLATT, CH., DONOGHUE, H., SPIGELMAN, M. a BRITTAİN, D.

Mycobacterium tuberculosis Complex DNA from an Extinct Bison Dated 17,000 Years before the Present. *Clinical Infectious Diseases*. 2001, vol. 33, issue 3, s. 305-311. DOI: 10.1086/321886. Dostupné

z: <<http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/321886>>.

SHIELS, M. S., D. ALBANES, J. VIRTAMO a E. A. ENGELS. *Increased Risk of Lung Cancer in Men with Tuberculosis in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study*. *Cancer Epidemiology Biomarkers*. 2011-03-31, vol. 20, issue 4, s. 672-678. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-1166. Dostupné

z: <<http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-10-1166>>.

SCHINDLER, J.. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010, 223 s., [24] s. příl. ISBN 978-802-4731-704.

SLATER, M., PARSONNET, J. a BANAEI, N.. *Investigation of False-Positive Results Given by the QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012-08-15, vol. 50, issue 9, s. 3105-3107. DOI: 10.1128/JCM.00730-12. Dostupné

z:<<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00730-12>>.

TODD, B. *The QuantiFERON-TB Gold Test: a new blood assay offers a promising alternative in tuberculosis testing*. 2006, Nurs Am J. Jun;106(6):33-4, 37. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16728840>>.

ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR.(ÚZIS)
Tuberkulóza a respirační nemoci 2012 [online]., 2012, ISBN 978-80-7472-065-9.
Dostupné z: <<http://www.openaspdf.com/files/3260713/tbc2012.pdf> >.

VANEECHOUTTE, M., BEENHOUWER, H. DE, CLAEYS, G., VERSCHRAEGEN, G., ROUCK, A. DE, PAEPE, N., ELAICHOUNI, A. and PORTAELS, F. *Identification of Mycobacterium species by using amplified ribosomal DNA restriction analysis*. Department of Clinical Chemistry, Microbiology & Immunology, University Hospital, Ghent, Belgoum. 1993. Dostupné z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265696/>>.

VENCOVSKÝ, J. a VÝBOR ČESKÉ REVMATOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI.
Bezpečnost biologické léčby – doporučení České revmatologické společnosti. Čes. Revmatol., 17, 2009, No. 3, p. 146–160.

VOTAVA, M.. *Lékařská mikrobiologie obecná: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., přepr. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-868-5000-5.

VŠEOBECNÁ ZDRAVOTNÍ POJIŠŤOVNA ČESKÉ REPUBLIKY. *Metodika k provádění pravidelného očkování proti tuberkulóze v ČR*. Dostupné z: <<http://www.vzp.cz/poskytovatele/infoservis-a-akcent/infoservis/infoservis-07-2012/metodika-k-provadeni-pravidelneho-ockovani-proti-tuberkuloze-v-cr>>.

YILMAZ, N., ZEHRA AYDIN, S., INANC, N., KARAKURT, S., DIRESKENELI, H.a YAVUZ, S.. *Comparison of QuantiFERON-TB Gold test and tuberculin skin test*

for the identification of latent Mycobacterium tuberculosis infection in lupus patients.
Lupus. 2012-03-30, vol. 21, issue 5, s. 491-495. DOI: 10.1177/0961203311430700.
Dostupné z: <<http://lup.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/0961203311430700>>.

ZATLOUKAL, P. a KOS, S.. *Tuberkulóza dospělých – Standard léčebného plánu.*
Česká pneumologická a ftizeologická společnost Jana Evangelisty Purkyně, Guidelines.
2013. Dostupné z: <<http://www.pneumologie.cz/guidelines/>>.

Příloha č. 1: Naměřené hodnoty optické denzity z všech jamek v destičce fotometrem s filtrem 450 nm a s referenčním filtrem nastaveným na 630 nm.

revelation0510QTB.DAT
Site ID: 0510QTB

Printed on 10.5.2012 at 12:21:57
Quantiferon TB

Page 1 of 1

DYNEX TECHNOLOGIES REVELATION 4.25

Name :
Address :
Phone :
Fax :

TEST NO. :
TEST NAME : QUANTIF
SITE : 0510QTB

W/L MODE : DUAL
TEST FILTER : 450 nm
REF. FILTER : 630 nm

DATE : 10.5.2012
TIME : 12:21:37
OPERATOR : Bednářová

VER limit : 4.000
Calculation mode : Endpoint

DATA MATRIX/TABLE : OD

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.983	2.314	2.303	0.028	0.028	1.955	0.000	-0.000	-0.000	-0.000	-0.000	-0.000
0.710	0.763	0.740	0.021	0.021	3.161	0.000	-0.000	-0.000	-0.000	0.000	-0.000
0.209	0.218	0.202	0.027	0.021	3.854	0.000	-0.000	-0.000	0.000	0.000	-0.000
0.015	0.024	0.015	0.026	0.636	2.295	0.000	-0.000	-0.000	0.000	0.000	0.000
0.234	0.266	0.164	0.034	0.041	3.921	0.000	-0.000	-0.000	0.000	0.000	0.000
0.033	0.051	3.745	0.003	0.007	0.013	0.000	-0.000	-0.000	0.000	0.000	-0.000
0.012	0.017	1.374	0.002	0.006	0.023	0.000	-0.000	-0.000	0.000	0.000	-0.000
0.005	0.018	0.996	0.000	0.005	0.016	0.000	-0.000	-0.000	0.000	0.000	-0.000

***** Indicates an unread well or value out of range

DYNEX TECHNOLOGIES

Příloha č. 2: Protokol kontroly kvality testu a stanovení množství interferonu gama v každém vzorku (IU/ml)

2 of 2



Version 2.33

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube Results

Test Date: čtvrtek 10 květen 2012
 Operator: Bednářová
 Run Number: QTB
 Kit Batch Number: 51432

Std	Conc	Mean	% CV	QC Result
S1	4,00	2,200	8,5	PASS
S2	1,00	0,738	3,6	PASS
S3	0,25	0,210	N/A	PASS
S4	0,00	0,018	N/A	PASS

Intercept: -0,3593 Slope: 0,8478 Correlation Coefficient: 1 (PASS)

Raw Data OD

	Nil	TB Ag	Mitogen	Nil	TB Ag	Mitogen
A	1,983	2,314	2,303	0,028	0,028	1,955
B	0,710	0,763	0,740	0,021	0,021	3,161
C	0,209	0,218	0,202	0,027	0,021	3,854
D	0,015	0,024	0,015	0,026	0,636	2,295
E	0,234	0,266	0,164	0,034	0,041	3,921
F	0,033	0,051	3,745	0,003	0,007	0,013
G	0,012	0,017	1,374	0,002	0,006	0,023
H	0,005	0,018	0,996	0,000	0,005	0,016

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube results are interpreted as follows:

Mitogen-Nil _a (IU/mL)	TB-Specific Antigen - Nil _a (IU/mL)	Result	Interpretation
>= 0.5	>= 0.35	QuantiFERON®-TB Gold Positive	<i>M.tuberculosis</i> infection likely
< 0.5	>= 0.35	QuantiFERON®-TB Gold Positive	<i>M.tuberculosis</i> infection likely
>= 0.5	< 0.35	QuantiFERON®-TB Gold Negative	<i>M.tuberculosis</i> infection NOT likely
< 0.5	< 0.35	QuantiFERON®-TB Gold Indeterminate	Result not obtained

^aMitogen - Nil must be >= 0.5 IU/mL OR TB Ag - Nil must be >= 0.35 IU/mL for a subject to have a valid QuantiFERON®-TB Gold In-Tube result.

For a patient to be considered POSITIVE for *M.tuberculosis* infection, the TB-Specific Antigen response must be >= 0.35 IU/mL.

The Mitogen control tube generally elicits the greatest IFN-gamma response of the 3 samples from each subject. In some cases the Mitogen Positive control OD value will be above the limit of the microplate reader; this has no impact on the test interpretation. Under most circumstances the Nil control will not generate IFN-gamma above 2.0 IU/mL. The IFN-gamma level of the Nil control is considered background and is subtracted from the other results for that blood specimen.

The cut-off for the QuantiFERON®-TB Gold test is 0.35 IU/mL above the Nil control for the TB-Specific Antigen stimulated plasma samples. Individuals displaying a response to the TB-Specific Antigen above this cut-off are likely to be infected with *M.tuberculosis*.


Confirmation of positive samples is recommended. Refer to QuantiFERON®-TB Gold In-Tube Package Insert for further details.

The magnitude of the measured IFN-gamma level cannot be correlated to stage or degree of infection, level of immune responsiveness, or likelihood for progression to active disease. A positive QuantiFERON®-TB Gold result does not necessarily indicate the presence of active tuberculosis disease. Other diagnostic procedures, such as X-ray examination of the chest and microbiological examination of sputum, should be used when TB disease is suspected.

More detailed information can be found in the 'Interpretation of Results' and 'Physician's Instructions' sections of the QuantiFERON®-TB Gold In-Tube Package Insert.

Příloha č. 3: Vyhodnocení výsledků metody analyzačním softwarem QuantiFERON®-TB Gold In-Tube Analysis Software

1 of 2



Version 2.33

QuantiFERON®-TB Gold In-Tube Results

Test Date: čtvrtek 10 květen 2012
Operator: Bednářová
Run Number: QTB
Kit Batch Number: 51432

Valid ELISA test run.

Subject ID	Nil		TB Ag		Mitogen		Result
	Nil	TB Ag	Mitogen	TB Ag- Nil	Mitogen- Nil		
728	0,28	0,32	0,18	0,04	-0,10	INDETERMINATE	
729	0,03	0,05	7,25	0,02	7,22	NEGATIVE	
730	0,01	0,01	2,22	0,00	2,21	NEGATIVE	
731	0,00	0,01	1,52	0,01	1,52	NEGATIVE	
732	0,02	0,02	3,37	0,00	3,35	NEGATIVE	
733	0,02	0,02	5,94	0,00	5,92	NEGATIVE	
734	0,02	0,02	7,50	0,00	7,48	NEGATIVE	
735	0,02	0,90	4,07	0,88	4,05	POSITIVE	
736	0,03	0,04	7,66	0,01	7,63	NEGATIVE	

Signature *[Signature]* Date 10/5 2012

reprint 11/5 2012 OJ

1
1
7