

## **Vyšetření na tuberkulosu a mykobakteriosy**

**Zpracoval:** prim. RNDr. Roman Jirsa, Oddělení klinické mikrobiologie ONMB

**Oponoval:** prim. MUDr. Jan Kára, Plicní oddělení ONMB

### **Prováděná vyšetření:**

1. Mikroskopické a kultivační vyšetření (základní + „zrychlená“ kultivace v automatickém detekčním systému).
2. Molekulárně-biologický (Real-time PCR) průkaz TBC
3. Průkaz TBC na základě buněčné (Quantiferon) a humorální (protilátky) imunitní odpovědi organismu

### **1. Mikroskopické a kultivační vyšetření**

#### **Indikace:**

Mikroskopické a kultivační vyšetření zůstává základním typem vyšetření při podezření na TBC či jinou mykobakteriosu. Prokazuje většinu klinicky významných druhů mykobakterií včetně tzv. Atypických. *M. leprae* a některé vzácně se vyskytující mykobakterie nejsou kultivovatelné

#### **Vyšetřovaný materiál:**

##### **A. Sputum, BAL:**

**Indikace:** Sputum (eventuelně BAL) je základním vyšetřovaným materiálem při podezření na plicní TBC či jinou mykobakteriosu. Toto vyšetření by mělo být provedeno i při podezření na *mimoplicní TBC*, zejména není-li přímý odběr z předpokládaného extrapulmonálního ložiska možný či účelný.

**Odběr materiálu:** Odběr sputa se provádí do širokých umělohmotných zkumavek. Velmi důležitý je kvalitní odběr sputa. U špatně vykašlávajících pacientů je záchytnost ze sputa výrazně nižší. V těchto případech je proto vhodné vyšetření doplnit imunologickým nebo molekulárně-biologickým průkazem TBC (viz výše).

**Označení žádanky:** Je třeba zřetelně vyznačit, že se jedná o cílené vyšetření na mykobakterie (např. „sputum na BK, sputum na mykobakterie, apod.)

##### **Interpretace výsledku:**

**a. Negativní mikroskopie a kultivace:** Je-li první odběr negativní je třeba jej u suspektních pacientů nejméně dvakrát zopakovat, u vysoce suspektních pacientů s negativní mikroskopií opakovat vícenásobně. **TBC nelze vyloučit na základě mikroskopické a kultivační negativity z jednoho odběru** - falešně negativní výsledky z jednoho odběru jsou poměrně časté, zejména u špatně vykašlávajících pacientů. Totéž ve zvýšené míře platí při podezření na *mimoplicní TBC*, kde je množství vykašláváných mykobakterií a záchytnost ze sputa nižší než v případě plicní TBC – zde by měli být tři odběry sputa absolutním minimem. Při latentní TBC je mikroskopické a kultivační vyšetření obvykle negativní.

**b. Pozitivní mikroskopie:** V našem regionu cca 1/2 vzorků sputa v nichž jsou mikroskopicky přítomny acidorezistentní tyčky (ART) připadá na vrub infekci *M. tuberculosis*,

zbytek jsou infekce či prostá kolonizace respiračního traktu netuberkulosních mykobakteriemi. U mikroskopicky pozitivních vzorků provádíme automaticky Real-Time PCR pro rychlý průkaz M. tuberculosis – je-li PCR pozitivní, lze infekci předběžně považovat za prokázanou. Definitivním výsledkem je ale až konečný výsledek kultivace.

## **B. Moč**

**Indikace:** Vyšetření moči je základním požadovaným vyšetřením při podezření na renální TBC. Vyšetření moči lze dále spolu s vyšetřením sputa použít při podezření na jinou formu extrapulmonální TBC, má však obecně nižší záchytnost nežli vyšetření sputa.

**Způsob odběru:** Odebírá se 50-100 ml středního proudu ranní moči standardním způsobem (viz kapitola Mikrobiologické vyšetření moči) do vhodné přepravní nádoby (pokud možno sterilní). Odběr se **zopakuje minimálně ještě dvakrát v dalších dnech.**

Označení žádanky: viz sputum

### **Interpretace výsledku:**

**a. Negativní mikroskopie a kultivace.** Množství mykobaterií v moči bývá nízké, průkaz renální TBC z moči může být tudíž obtížný a negativní výsledek nevylučuje infekci M. tuberculosis. Při podezření na renální či extrapulmonální TBC je velmi vhodné kultivační vyšetření alespoň z jednoho odběru doplnit molekulárně-biologickým průkazem (provádíme automaticky z prvního odběru), při negativním výsledku a trvajícím suspekci vyšetřením imunologickým (Quantiferon+protilátky – viz níže).

**b. Pozitivní mikroskopie:** Vzhledem k poměrně časté kolonizaci močového nepatogenními mykobakteriemi je třeba při pozitivní mikroskopii vyčkat výsledku molekulárně-biologického (u mikroskopicky pozitivních vzorků provádíme PCR automaticky) případně kultivačního výsledku.

## **B. Výpotky – pleurální, peritoneální, perikardiální, aj.**

**Indikace, interpretace:** Záchytnost mykobakterií z výpotků je obecně nízká z důvodů malého počtu bakterií ve vzorku. Tam kde to je možné by mělo být upřednostněno vyšetření bioptického materiálu – např. granulomy, spádové uzliny, vícečetné pleurální biopsie), vhodným doplňkem je vyšetření sputa (viz výše) a imunologický průkaz TBC (viz níže). Molekulárně-biologický průkaz TBC (PCR) zvyšuje záchytnost a zařazujeme jej proto u tohoto materiálu automaticky.

**Způsob odběru:** Odebraného materiálu by mělo být co nejvíce – maximalizace objemu odebraného materiálu zvyšuje pravděpodobnost záchytu.

**Označení žádanky:** viz Sputum

## **C. Lymfatické uzliny a hnis**

**Indikace:** Při lymfadenopatiích a zejména při periferně lokalizovaných hnisavých procesech se vedle M. tuberculosis mohou klinicky významně uplatnit jiné druhy mykobakterií. Na **mykobakteriosu** by se u hnisavých procesů mělo myslet mmj. zejména tehdy, není-li v hnisu či stěru z pístěle a rány opakovaně nalezen signifikantní patogen.

Molekulárně-biologický průkaz TBC (PCR) zvyšuje záchytnost a zařazujeme jej proto u tohoto druhu materiálu automaticky.

**Způsob odběru a interpretace:** Individuální, eventuálně na základě konzultace s námi nebo s pneumologem.

**Označení žádanky:** Viz sputum

## **D. Kyretáž, menstruační krev, liquor, gastrický aspirát, biopsie, laryngeální výtěr, stolice, aj.**

U tohoto méně často požadovaného materiálu doporučujeme individuální konzultaci s námi nebo s pneumologem.

## **2. Molekulárně-biologický (Real-Time PCR) průkaz *M. tuberculosis***

### **Indikace:**

1. Ze sputa pro zrychlení diagnostiky a zlepšení citlivosti záchytu u vysoce suspektních pacientů
2. Z moče pro zvýšení citlivosti záchytu
3. Součást rutinního testování obtížně (invazivně) odebraného materiálu – zlepšení citlivosti.

### **Způsob odběru:**

Shodný s odběrem na mikroskopii a kultivaci. Materiál nelze umístit do zkumavek s heparinem (inhibice PCR).

### **Interpretace:**

Test je vysoce specifický – nezaznamenali jsme zkřížené reakce s jinými druhy mykobakterií ani jiné typy zkřížených reakcí. Při pozitivním výsledku je však třeba vyčkat výsledku opakovaného vyšetření téhož materiálu pro vyloučení laboratorní kontaminace.

Citlivost testu převyšuje citlivost mikroskopického vyšetření materiálu a pohybuje se kolem prahu citlivosti kultivačního vyšetření. Pozitivita PCR u mikroskopicky pozitivního vzorku proto s vysokou spolehlivostí ukazuje na infekci *M. Tuberculosis*, negativita PCR u mikroskopicky pozitivního vzorku s vysokou spolehlivostí ukazuje na kolonizaci či infekci jiným druhem mykobakterií.

Samotná pozitivita PCR ověřená opakovaným vyšetřením téhož vzorku v laboratoři ukazuje se značnou spolehlivostí na přítomnost *M. tuberculosis* i při negativním výsledku kultivace. Zvýšené opatrnosti v interpretaci je však v tomto případě třeba zejména u pacientů s dřívější přeléčenou TBC, neboť není zcela jasné jak dlouhou dobu je zachytitelná DNA u mrtvých mykobakterií.

## **3. Průkaz TBC na základě buněčné (Quantiferon) a humorální (IgG, IgA a IgM protilátky) imunitní odpovědi organismu**

### **Indikace:**

1. Pacienti u nichž je jiný způsob průkazu obtížný (suspektní extrapulmonální TBC, špatně vykašlávající pacienti, apod.)
2. Vysoce suspektní pacienti či pacienti v těžkém stavu u nichž je třeba urychlit diagnostiku
3. V případě Quantiferonu dále pacienti u nichž je třeba vyloučit latentní TBC (plánovaná léčba anti-TNF či jiná vysoce immunosupresivní léčba, kontakty s TBC, sporné výsledky kožního tuberkulinového testu).

### **Způsob odběru:**

#### **A. Quantiferon:**

Odběr se provádí do tří speciálních zkumavek. Odebere 3 ml krve ze žíly a rozdělte je po rovnoměrně jednom mililitru do každé ze tří QuantiFERON®-TB Gold In-tube odběrových zkumavek – do jedné (1) s červeným víčkem, do jedné (2) s šedým víčkem a do jedné (3) s fialovým víčkem). Linka na straně zkumavky označuje objem 1 ml. QuantiFERON®-TB Gold In-Tube odběrové zkumavky byly validovány pro rozmezí objemů 0,8 až 1,2 ml. Pokud není hladina krve v nějaké zkumavce blízko vyznačené linky, doporučuje se odebrat krev znovu. **V infjekkční**

**stříkačce kterou provádíte odběr nesmí být žádný antikoagulační roztok, zejména ne EDTA a citrát – jinak dojde ke kompletní inhibici testu.**

**Promíchejte zkumavky opakovaným obracením dnem vzhůru 8–10 x.** Antigeny s nimiž reagují krevní T-lymfocyty jsou naneseny na vnitřní stěně zkumavky, takže je velmi důležité, aby byl obsah zkumavky dobře promíchán s krví.

Zkumavky po promíchání skladujte ve vertikální poloze víčkem vzhůru při pokojové teplotě. Vzoroky krve neochlazujete ani nezmrazujete. Zkumavky musí být **dopraveny do laboratoře co nejdříve, nejdéle však do 16 hodin po odběru.**

## **B. Protilátky:**

Standardní odběr stážílivé krve. Vyšetření protilátek lze provést rovněž z krve odebrané do zkumavek pro test Quantiferon.

## **Interpretace imunologických testů:**

Test Quantiferon a průkaz protilátek jsou založeny na dvou rozdílných drahách imunitního systému (buněčná versus humorální imunita). U pacientů s aktivní TBC obvykle dochází k výrazné stimulaci alespoň jedné z těchto drah, méně často však k dostatečné stimulaci obou dvou současně - testy Quantiferon a průkaz protilátek se proto vhodně doplňují a u pacientů s aktivní TBC je obvykle pozitivní alespoň jeden z testů. Doporučujeme proto u pacientů se suspekci na aktivní TBC požadovat oba testy společně.

**1. Quantiferon** má nízkou četnost falešně pozitivních výsledků a pozitivita testu svědčí s vysokou pravděpodobností pro latentní nebo aktivní TBC. Pozitivitu testu je vhodné ověřit opakovaným vyšetřením z nového odběru, ve sporných případech konzultujte další postup s pneumologem nebo s námi. U pacientů hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče je nutné očekávat nižší spolehlivost výsledku (u těchto pacientů často slabá imunitní odpověď ke kontrolní antigenní stimulaci).

V testu Quantiferon se zejména u pacientů z jednotek intenzivní péče poměrně často vyskytují výsledky, které laboratorně interpretujeme jako „nemožnost vyloučit TBC vzhledem ke slabé imunitní odpovědi ke stimulaci T-lymfocytů kontrolním antigenem“. V těchto případech je spolehlivost testu snížena, výsledek lze nicméně v zásadě interpretovat jako negativní za předpokladu, že byl správně proveden odběr a vzorek včas dopraven do laboratoře.

**2. Protilátky proti TBC** vykazují nízkou četnost falešně pozitivních výsledků IgG (méně než 5% falešných pozitivit), ale vysokou četnost zkřížených reaktivit IgM a IgA. Pro TBC je výrazně suspektní pozitivita IgG protilátek, případně kombinovaná pozitivita IgM a IgA protilátek. Jsou-li pozitivní jen samotné IgA nebo jen samotné IgM jedná se častěji o zkříženou reaktivitu.

Protilátky proti TBC bývají na rozdíl od testu Quantiferon obvykle pozitivní jen u pacientů s aktivní TBC nebo s aktivní TBC v nedávné anamnéze, u pacientů s latentní TBC je pozitivita protilátek málo častá. Souběžná pozitivita testů Quantiferon a protilátek proto ukazuje na aktivní TBC, často jsou však při aktivní TBC pozitivní jen Quantiferon nebo naopak jen protilátky.

Při pozitivitě protilátek by měla být v diferenciální diagnostice zvažena invazivní mykotická infekce (možnost zkřížených reaktivit), zkřížené reaktivity mohou být i při některých mykobakteriosách.

Výsledky imunologických testů je vždy třeba interpretovat opatrně a v případě podezření na aktivní TBC je bezpodmínečně nutné se pokusit o definitivní průkaz mikroskopickým a kulturačním vyšetřením.

