

GIỚI THIỆU XÉT NGHIỆM T-SPOT.TB

(Oxford Immunotec.Ltd)

1. Mục đích:

Đây là một test chẩn đoán trong labo nhằm phát hiện tình trạng nhiễm Mycobacterium Tuberculosis bao gồm cả nhiễm lao tiềm ẩn và lao hoạt động.

Xét nghiệm IGRA (Interferon Gamma Release Assays) bao gồm :

Quantiferon TB gold plus

T-SPOT.TB

2. Nguyên lý:

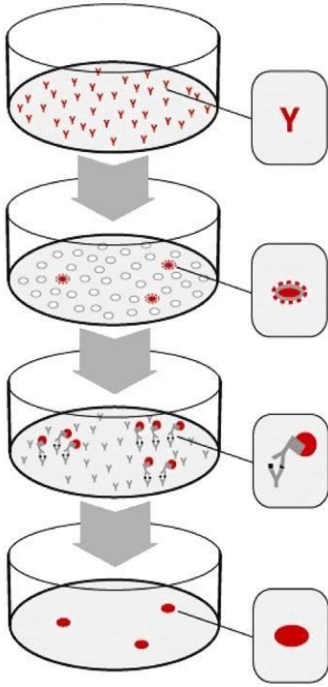
Bạch cầu hạt đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) được tách từ máu toàn phần và rửa để loại bỏ các chất gây nhiễu. PBMC sẽ được đếm để có một số lượng theo tiêu chuẩn để sử dụng cho test. Điều này đảm bảo cho thậm chí cả những người có số lượng tế bào T thấp do miễn dịch yếu (Không có khả năng miễn dịch hoặc miễn dịch bị ức chế) đều có đủ số lượng tế bào T cho vào trong các giếng. Quá trình rửa và đếm như kỹ thuật ELISPOT sẽ rất hữu hiệu trong việc phát hiện Bệnh lao và nhiễm lao tiềm ẩn.

4 giếng (như hình 1) được sử dụng cho mỗi một mẫu:

1. Nil Control để xác định hoạt hóa không đặc hiệu của tế bào.
2. TB-specific antigens, Panel A (ESAT-6).
3. TB-specific antigens, Panel B (CFP10).
4. Positive Control chứa phytohaemagglutinin (PHA, chất hoạt hóa đa dòng 12) để xác định chức năng của PBMC.

PBMC được ủ với kháng nguyên, bất kỳ tế bào T đã nhạy cảm có mặt sẽ bị kích thích. Cytokine được tiết ra sẽ bị bắt bởi kháng thể đặc hiệu trên màng, gắn trên đáy giếng. Các tế bào và các thành phần thừa khác sẽ được rửa để loại bỏ. Kháng thể thứ hai, gắn với alkaline phosphatase và với một epitope khác trên phân tử cytokine được thêm vào và gắn với phần cytokine gắn trên bề mặt màng. Các thành phần conjugate không gắn sẽ được rửa loại bỏ. Dung dịch Substrate sẽ được thêm vào mỗi giếng. Sau đó nó được tách ra bởi các enzyme đã gắn tạo thành các điểm ngưng kết không hòa tan tại chỗ phản ứng. Mỗi một điểm đại diện cho dấu vết của một tế bào T tiết cytokine. Đếm số điểm thu được tương ứng với số lượng tế bào T hoạt hóa nhạy cảm với M. tuberculosis trong máu ngoại vi.

Hình 1: Nguyên tắc của xét nghiệm T-SPOT.TB



Đầu tiên một mẫu máu được thu thập từ bệnh nhân. Các tế bào bạch cầu được tách ra và sau đó được đưa vào giếng của một tấm 96 giếng. Đáy giếng được phủ trước bằng kháng thể ∇ có ái lực cao với Interferon-gamma (IFN- γ), một cytokine được giải phóng bởi các tế bào T hoạt hóa khi nhiễm lao.

Các kháng nguyên Vi khuẩn TB được thêm vào các giếng có các tế bào bạch cầu để kích thích tiết IFN- γ từ tế bào T đã từng phản ứng với vi khuẩn lao. Các kháng nguyên được chọn chỉ M. Tuberculosis mới có để chỉ đo các phản ứng của các tế bào T đặc hiệu cho bệnh lao.

Các tế bào T đáp ứng đặc hiệu với kháng nguyên \bullet giải phóng cytokine \blacksquare . Cytokine này được các kháng thể lót dưới đáy giếng bắt giữ ngay lập tức tại vùng lân cận của các tế bào T.

Sau một thời gian ủ ngắn, các giếng được rửa sạch, loại bỏ các kháng nguyên và tế bào khỏi giếng. Một kháng thể thứ hai liên hợp ∇ sau đó được thêm vào để liên kết với IFN- γ được tiết ra bởi các tế bào T (và được bắt giữ bởi kháng thể chính).

Một chất nền được thêm vào để tạo các chấm (\bullet) trong đó IFN- γ được tiết ra bởi các tế bào T. Số lượng chấm được đếm.

3. Mẫu bệnh phẩm:

Máu toàn phần chống đông heparin.

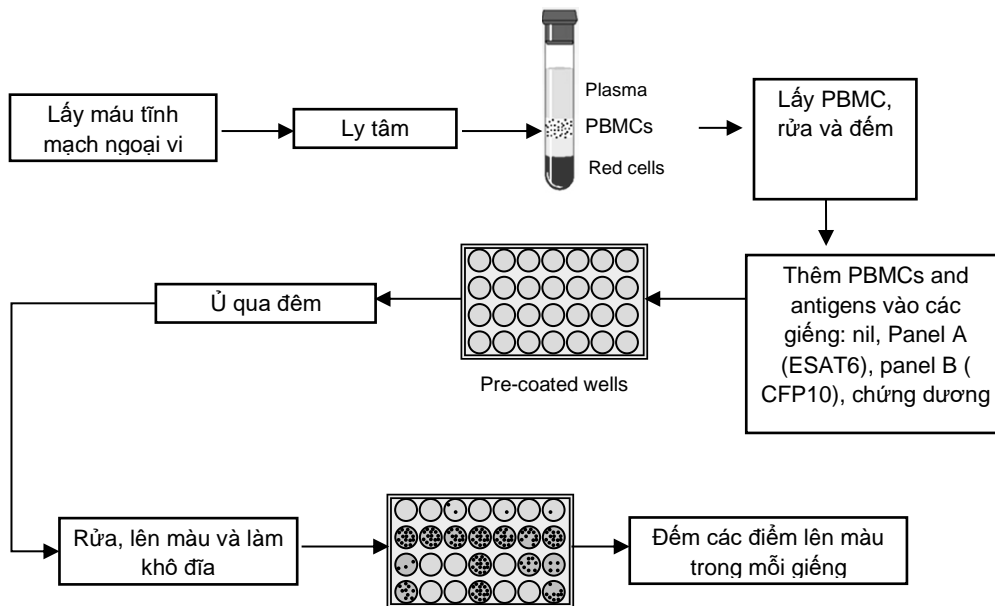
6 mL: người lớn và trẻ em ≥ 10 tuổi

4 mL: trẻ em ≥ 2 đến < 10 tuổi

2 mL: trẻ em < 2 tuổi

4. Quá trình thực hiện:

Hình 2: Các bước chính của T-SPOT.TB test. Chú ý đây là đĩa chứa 96 giếng.



5. Kết quả:

5.1 Đánh giá QC (Quality Control) trước khi đọc kết quả:

- Giếng Nil: số điểm phải ≤ 10
Nếu > 10 điểm: kết luận : không xác định, phải làm lại xét nghiệm
- Giếng chứng dương: ≥ 20 điểm.
Nếu < 20 điểm: kết luận không xác định nếu giếng phản ứng cho kết quả ≤ 4 điểm.

5.2 Kết quả T-SPOT.TB:

Được xác định bằng cách lấy số điểm trong các Panel trừ số điểm trong Nil control. Sau đó theo công thức sau:

- Xét nghiệm trả lời dương tính, nếu Panel A-Nil control và/hoặc Panel B- Nil control ≥ 6
- Xét nghiệm trả lời âm tính, nếu cả 2 Panel A-Nil control và Panel B-Nil control ≤ 5 bao gồm cả các giá trị < 0

Kết quả dương tính cho thấy mẫu chứa tế bào Lympho T hoạt hóa phản ứng với *M.tuberculosis*

Kết quả âm tính cho thấy mẫu không chứa tế bào Lympho T hoạt hóa phản ứng với *M.tuberculosis*

Hướng dẫn gần đây nhất của CDC trong chẩn đoán nhiễm TB bao gồm cả bệnh:

- Xét nghiệm trả lời dương tính, nếu Panel A- Nil control và/hoặc Panel B- Nil control ≥ 8
 - Xét nghiệm trả lời âm tính, nếu cả 2 Panel A- Nil control và Panel B- Nil control ≤ 4 bao gồm cả các giá trị < 0
 - Giá trị cao nhất của Panel A – Nil control hoặc Panel B – Nil control là 5,6,7 điểm thì kết quả được cân nhắc là kết quả không rõ ràng, giáp ranh. Nên lấy lại mẫu làm lại. Nếu kết quả làm lại vẫn là không rõ ràng thì nên sử dụng các xét nghiệm khác và các thông tin dịch tễ để chẩn đoán tình trạng nhiễm lao của bệnh nhân.
- Chú ý: Chẩn đoán hay loại trừ bệnh lao và đánh giá khả năng nhiễm lao tiềm ẩn đòi hỏi phải kết hợp yếu tố dịch tễ, bệnh sử, khám xét, các xét nghiệm khác với xét nghiệm TSPOT.TB.

6. Độ nhạy, độ đặc hiệu:

Độ đặc hiệu: đánh giá trên 93 mẫu từ những người có nguy cơ thấp nhiễm M. tuberculosis thông qua đánh giá tiền sử và các thông tin cá nhân. Độ đặc hiệu đạt 100% (93/93) (với độ tin cậy 95 % độ đặc hiệu là 95.8 – 100%)

Độ nhạy: đánh giá trên 87 mẫu từ những người có XN nuôi cấy khẳng định nhiễm M. tuberculosis, bao gồm cả người miễn dịch giảm. Độ nhạy đạt 98.8% (86/87) (với độ tin cậy 95 % độ đặc hiệu là 90.8 – 99.9 %)

Độ lặp lại: Trên 145 mẫu từ 140 người được làm test 2 lần. 142/145 mẫu có kết quả giống nhau giữa 2 lần. (97.9%) 2 mẫu có kết quả không rõ ràng và chỉ có 1 mẫu cho kết quả khác nhau.

7. So sánh T-SPOT.TB và Quantiferon TB gold plus.

7.1 Giống nhau:

- Thuộc nhóm IGRA: dùng kháng nguyên đặc hiệu lao kích thích các lympho T đã nhạy cảm để tiết IFN γ .
 - Kháng nguyên đặc hiệu lao : ESAT 6 và CFP10
- 2 loại kháng nguyên này không có trong BCG và phần lớn các mycobacteria trong môi trường ngoại trừ M. kansasii, M.szulgai, M. marinum và M. gordonae.
- Luôn có bước ủ với kháng nguyên và bước xác định có phản ứng tiết IFN γ hay không nên thời gian xét nghiệm tương đương khoảng 24-30 giờ.

7.2 Khác nhau

Quantiferon TB gold plus.	T-SPOT.TB	Phân tích ưu nhược điểm của các phương pháp
Ủ 1ml máu toàn phần với kháng nguyên lao.	Ủ 250.000 PBMC được phân tách, rửa sạch từ máu toàn phần với kháng nguyên	- T-SPOT.TB không bị ảnh hưởng bởi các mẫu lấy từ người bệnh có lượng PBMC thấp. Do đó trong khi QFT có kết quả không xác định do miễn dịch bệnh nhân kém thì T.SPOT.TB

	lao	<p>vẫn đánh giá được đáp ứng của lympho effector với kháng nguyên đặc hiệu lao.</p> <ul style="list-style-type: none"> - T-SPOT.TB không bị ảnh hưởng bởi các thành phần có sẵn trong huyết tương của người bệnh như lượng IFN γ, lượng corticoid ... Do đó trong khi QFT có kết quả không xác định do giá trị IFN γ trong máu bệnh nhân quá cao > 8 IU/ml thì T-SPOT.TB vẫn đánh giá được đáp ứng của lympho effector với kháng nguyên đặc hiệu lao. - T-SPOT.TB có thêm giai đoạn tách, rửa và đếm PBMC nên đòi hỏi kỹ năng thực hiện và phương tiện đếm bạch cầu.
Đo lượng IFN γ trong các ống, xác định lượng IFN γ chênh lệch trong các ống có kháng nguyên với ống ngưỡng nền.	Đếm các điểm tại đó IFN- γ được tiết ra bởi các tế bào T trong các giếng.	<ul style="list-style-type: none"> - T-SPOT.TB không cần máy đọc quang như Quantiferon TB gold plus mà cần kính hiển vi hoặc các loại kính đọc khác.
		-

8. Ưu/ nhược điểm của T-SPOT.TB

8.1 Ưu điểm:

- Sử dụng kháng nguyên đặc hiệu lao ESAT 6, CFP 10 nên tính đặc hiệu cao, không bị ảnh hưởng bởi vacxin BCG, các chủng Mycobacteria khác ngoại trừ *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* và *M. goodnae*.
- Người bệnh chỉ đến 1 lần để lấy máu.
- Độ nhạy và độ đặc hiệu cao

	T-SPOT.TB	Quantiferon TB gold plus.	TST
Độ nhạy	90.8 – 99.9 %	90.9 – 97.9%	81.82%*

Độ đặc hiệu	95.8 – 100%.	95.6 – 98.8%	67%*
--------------------	--------------	--------------	------

- Tỷ lệ không xác định thấp. Có thể cho ra kết quả trên những mẫu XN Quantiferon TB Gold plus cho kết quả không xác định do lượng IFN γ trong ống Mitogen- Nil < 0,5 IU/ml và do IFN γ trong ống Nil > 8.0 IU/ml.

Tỷ lệ không xác định tại Bệnh viện Phổi Hà Nội thời gian từ 22/09/2020 đến 10/11/2020

	T-SPOT.TB	Quantiferon TB gold plus.
Tỷ lệ kết quả không xác định	0/50 mẫu (0%)	30/554 mẫu (5.4%) (chủ yếu là BN nặng, BN cơ xương khớp, BN HIV, Bệnh nhi) Các mẫu không xác định phần lớn do có: Mitogen- nil < 0,5 IU/ml Một số ít mẫu do Nil > 8.0 IU/ml

Kết quả T-SPOT.TB trên một số bệnh nhân có kết quả Quantiferon TB gold Plus không xác định được làm tại Bệnh viện Phổi Hà Nội trong thời gian từ 22/09/2020 đến 10/11/2020

BN	Kết quả Quantiferon TB gold plus.					Kết quả T-SPOT.TB					Kết quả
	Nil	TB1- Nil	TB2- Nil	Mitogen- Nil	Kết quả	Nil	Panel A	Panel B	Mitogen	Max (Panel A,B- Nil)	
1	0.1	0.02	0.03	0.19	KXĐ	0	1	1	≥ 20	1	Âm tính
2	0	0.01	0.01	0.08	KXĐ	3	2	1	≥ 20	-1	Âm tính
3	0.28	0.01	0.02	0.21	KXĐ	2	0	0	≥ 20	-2	Âm tính
4	0.01	- 0.01	0.02	0.28	KXĐ	3	6	8	≥ 20	5	Chưa rõ ràng, vùng ranh giới
5	0.01	0.26	0.16	0.05	KXĐ	1	4	1	≥ 20	3	Âm tính
6	0.18	0.04	0.04	0.15	KXĐ	2	3	2	≥ 20	1	Âm tính
7	9.43	0.32	0.34	1.4	KXĐ	3	4	2	≥ 20	1	Âm tính
8	8,31	3.42	3.04	3.5	KXĐ	2	≥ 20	≥ 20	≥ 20	≥ 20	Dương tính

8.2 Nhược điểm

- Nhân viên làm xét nghiệm phải có kỹ năng tách, rửa PBMC.
- Phải có phương tiện đếm số lượng bạch cầu.
- Đếm số điểm phản ứng còn bị ảnh hưởng bởi chủ quan của nhân viên thực hiện.

9. Kết luận

- T-SPOT.TB là 1 xét nghiệm thuộc nhóm IGRA nhằm phát hiện tình trạng lao hoạt động và lao tiềm ẩn nhưng chưa phân biệt được 2 nhóm này.
- Độ nhạy và độ đặc hiệu cao.
- Bằng phương pháp tách, rửa PBMC ra khỏi các yếu tố ảnh hưởng trong huyết tương như lượng IFN γ có sẵn, các chất ức chế miễn dịch như corticoid..., đếm lấy một số lượng cố định PBMC cho mỗi giếng phản ứng của mỗi bệnh nhân, T-SPOT.TB có vẻ có khả năng khắc phục được nhược điểm của Quantiferon TB gold plus là không xác định được tình trạng phản ứng với kháng nguyên lao trên các đối tượng có miễn dịch suy giảm gặp nhiều ở các bệnh nhi, bệnh nhân dùng corticoid kéo dài trong các bệnh cơ xương khớp, bệnh tự miễn, bệnh nhân HIV, bệnh nhân suy thận mãn tính...và các đối tượng có nồng độ IFN γ có sẵn quá cao trong máu ngoại vi.