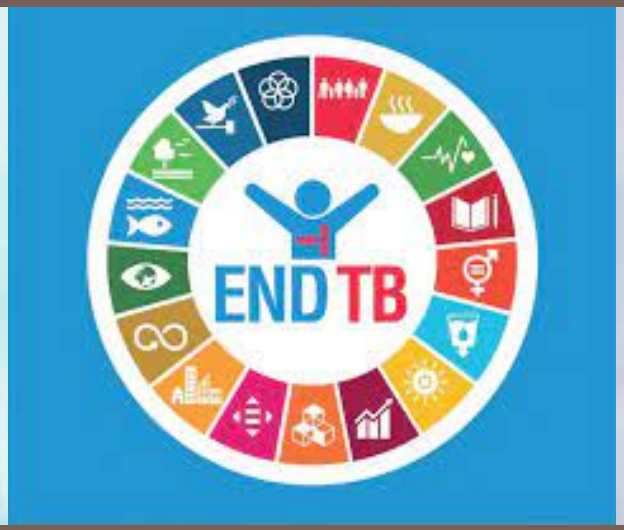
METODE POCT IGRA UNTUK DIAGNOSIS TB ANAK SHARING PENGGUNAAN QIAREACH



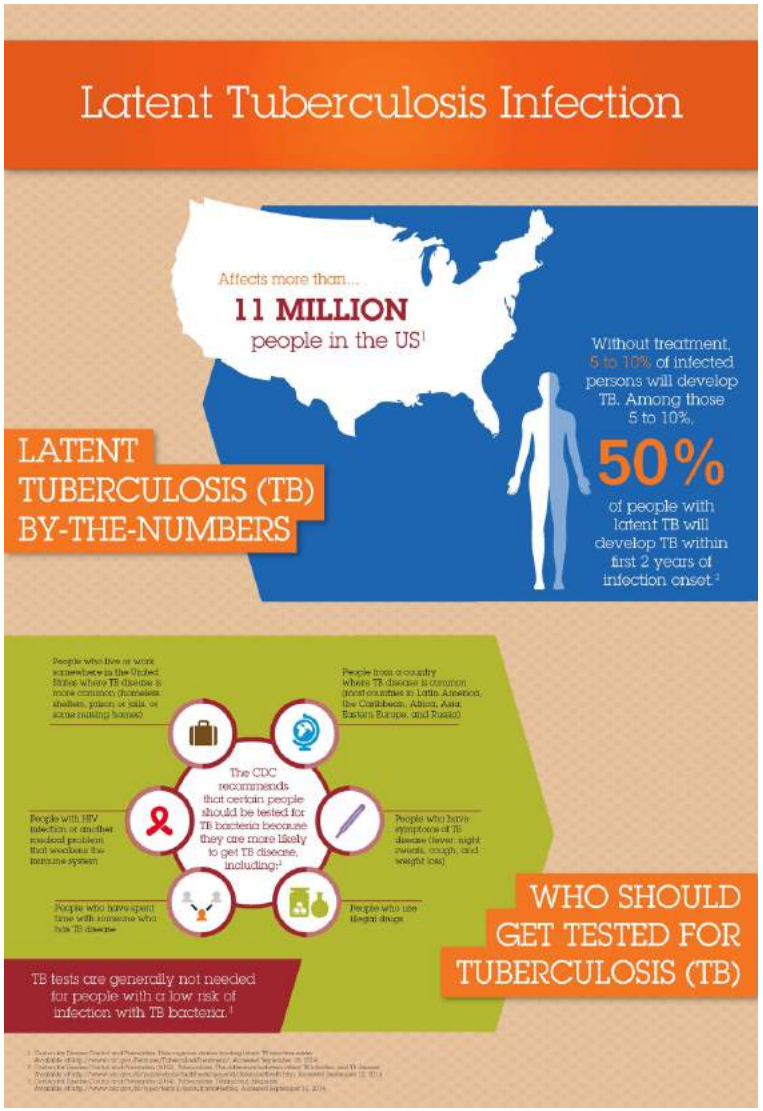
Oleh: Dr. Agustin Iskandar, MKes, SpPK(K)

PENDAHULUAN

- Diperkirakan 2 miliar orang di seluruh dunia terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) dan berisiko untuk berkembang menjadi penyakit TB.
- 5-20% ➔ TB aktif disepanjang hidup
- ±80% → TB laten → risiko menjadi aktif
- Rentang waktu teraktivasi ➔

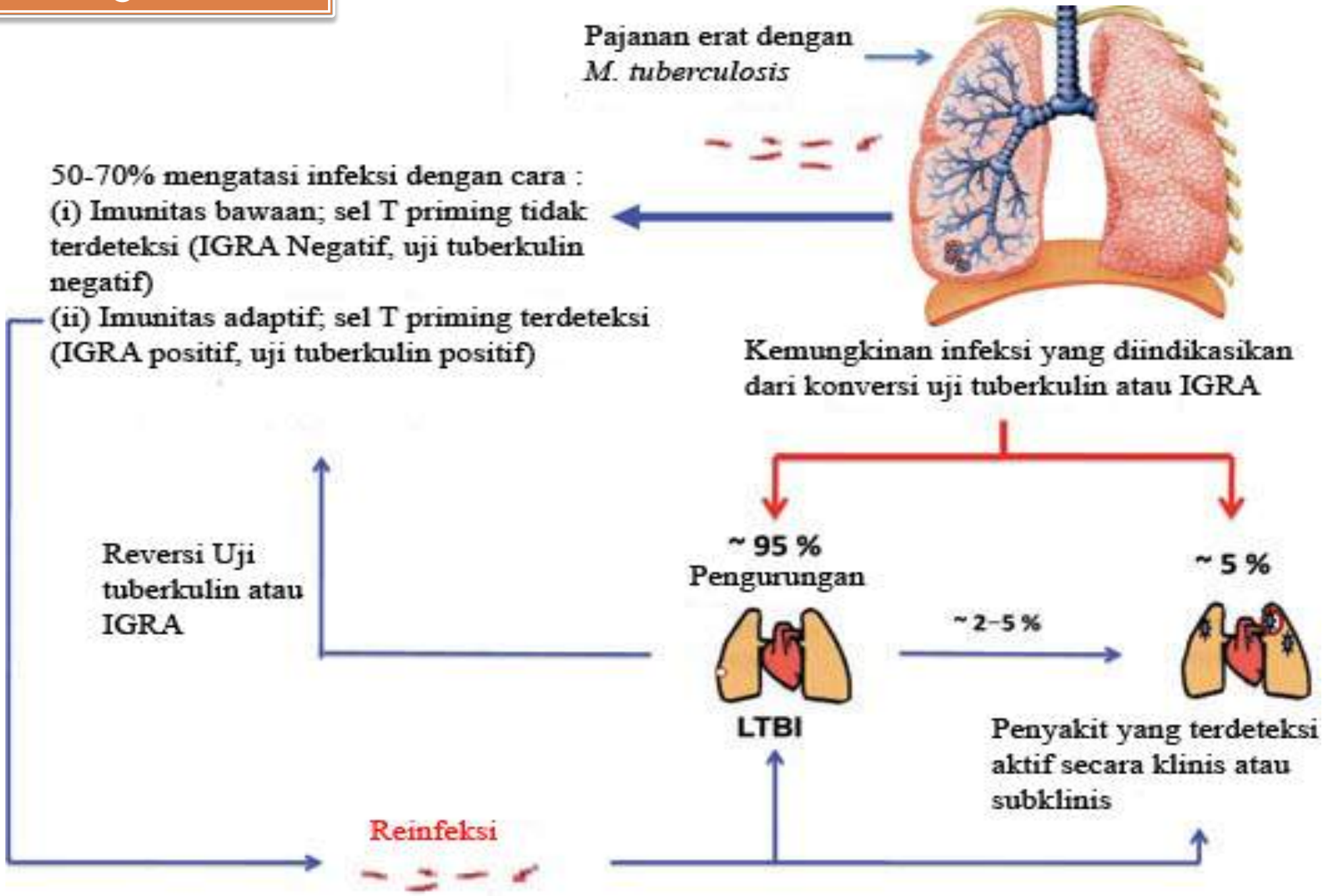
  2-5 tahun sejak infeksi awal.
- Infeksi HIV ➔ faktor risiko utama reaktivasi Infeksi laten TB.
- Fx risiko lain: keganasan, DM, px persiapan transplantasi organ dll.

Diperlukan alat diagnostic untuk deteksi ILTB, TB aktif dan resistensi obat.

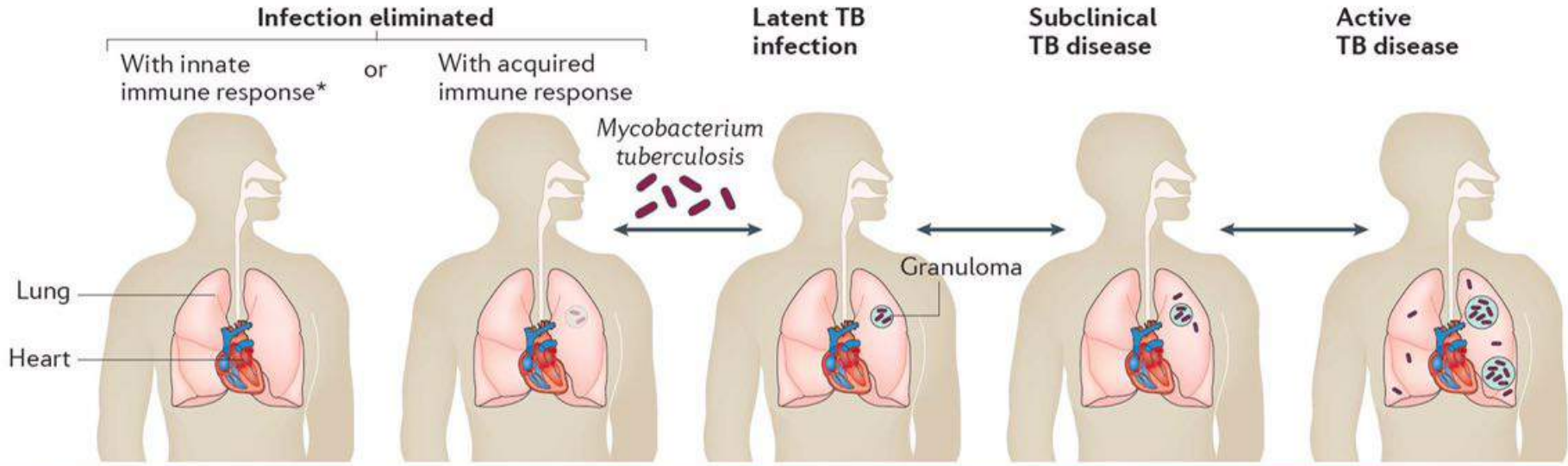


The End TB Strategy:WHO, 2022, available on: https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/the-end-tb-strategy

Patogenesis



Respirology (2010) **15**, 433–450



TST	Negative	Positive	Positive	Positive	Usually positive
IGRA	Negative	Positive	Positive	Positive	Usually positive
Culture	Negative	Negative	Negative	Intermittently positive	Positive
Sputum smear	Negative	Negative	Negative	Usually negative	Positive or negative
Infectious	No	No	No	Sporadically	Yes
Symptoms	None	None	None	Mild or none	Mild to severe
Preferred treatment	None	None	Preventive therapy	Multidrug therapy	Multidrug therapy

KRITERIA TB

TB Aktif

- Gejala/Tanda (+)
- TST (+) atau IGRA (+)

TB Laten

- Gejala/Tanda (-)
- TST (+) atau IGRA (+)

Infeksi Laten Tuberkulosis (ILTB) adalah suatu keadaaan dimana sistem kekebalan tubuh orang yang terinfeksi tidak mampu mengeliminasi bakteri Mycobacterium tuberculosis dari tubuh secara sempurna tetapi mampu mengendalikan bakteri TBC sehingga tidak timbul gejala sakit TBC (**Petunjuk Teknis Penanganan Infeksi Laten Tuberkulosis (ILTB), Kemenkes RI,** 2020

Bukan TB

- Gejala/Tanda (-)
- TST (-) atau IGRA (-)

WHO. Latent tuberculosis infection: updated consolidated guidelines for programmatic management. 2018. Available at http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260233/1/9789241550239-eng.pdf?ua=1

Pemeriksaan Laboratorium Diagnosis TB

Direct test

- Pewarnaan BTA / mikroskop
- Kultur Lowenstein Jensen
- Molekular nucleic acid techniques (PCR)
- Tes Cepat Molekular/ Gene Xpert

Indirect test

- Tuberculin skin testing (TST)
- **Interferon gamma release assays (IGRA)**

Interferon Gamma Release Assay (IGRA)

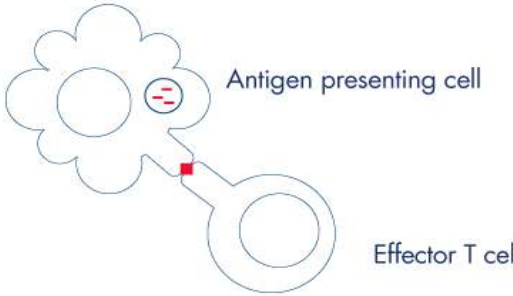
- *In vitro*, *indirect test*, kualitatif
- Antigen spesifik *Mycobacterium tuberculosis (ESAT-6 dan CFP-10)* memicu *T-cell host* melepaskan *interferon-*γ (IFN- γ) → kadar (IFN- γ) yang tinggi sebagai pertanda adanya infeksi TB
- IGRA komersial :
  - **QuantiFERON™Gold PLUS (QFT-PLUS)**
  - **QIAreach™QFT**
- Awalnya, berperan sebagai tes pengganti *tuberkulin skin test (TST)* pada sapi Australia yang akan diimpor
- Sekarang, IGRA atau TST direkomendasikan untuk mendeteksi LTBI (WHO, 2018) → *Zero TB* tahun 2050
- Belum tersedia *gold standard* untuk mendiagnosis LTBI

WHO. Latent tuberculosis infection: updated consolidated guidelines for programmatic management. 2018. Available at http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260233/1/9789241550239-eng.pdf?ua=1

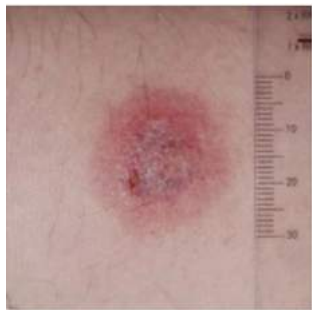
WHO merekomendasi IGRA sebagai alternatif diagnostik pada infeksi TB

Prinsip pemeriksaan IGRA dan TST

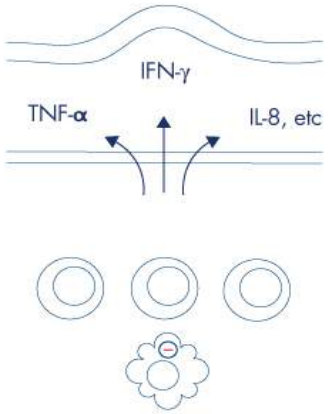
Presentation of mycobacterial antigens



Both the skin test and the QFT test measure T cell response, but differently

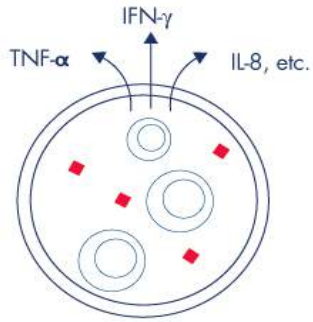


Skin test



Measurement of induration and erythema

In vitro blood test



Measurement of IFN-γ production

IGRA **VS** TST

IGRA	TST
1 kali kedatangan	2 kali kedatangan
Hasil dalam <72 jam	Hasil dalam 72 jam
Darah lengkap yang diinkubasi, tanpa proses isolasi dan hitung sel darah (in vitro)	PPD yang diinjeksikan ke kulit (in vivo)
Tidak dipengaruhi oleh vaksin BCG (*booster*)	Dipengaruhi oleh vaksin BCG
Tidak dipengaruhi kondisi *immunocompromised*	Dipengaruhi kondisi *immunocompromised*
Deteksi IFN-γ dengan alat/*software*	Dipengaruhi efek *booster*
Sensitivitas 95,3% , spesifisitas 97,6%	Observasi/pengukuran indurasi secara manual
	Sensitivitas 70%, Spesifisitas 59% (bervariasi)

Qiagen. QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) ELISA Package Insert.

SPESIFISITAS ANTIGEN ESAT-6 DAN CFP-10

Tuberculosis Complex	ESAT-6	CFP-10
M tuberculosis	+	+
M africanum	+	+
M bovis	+	+
BCG substrain		
gothenburg	-	-
moreau	-	-
tice	-	-
tokyo	-	-
danish	-	-
glaxo	-	-
montreal	-	-
pasteur	-	-

Environmental strains	ESAT-6	CFP-10
M abcessus	-	-
M avium	-	-
M branderi	-	-
M celatum	-	-
M chelonae	-	-
M fortuitum	-	-
M gordonii	-	-
M intracellulare	-	-
M kansasii	+	+
M malmoense	-	-
M marinum	+	+
M oenavense	-	-
M scrofulaceum	-	-
M smegmatis	-	-
M szulgai	+	+
M terrae	-	-
M vaccae	-	-
M xenopi	-	-

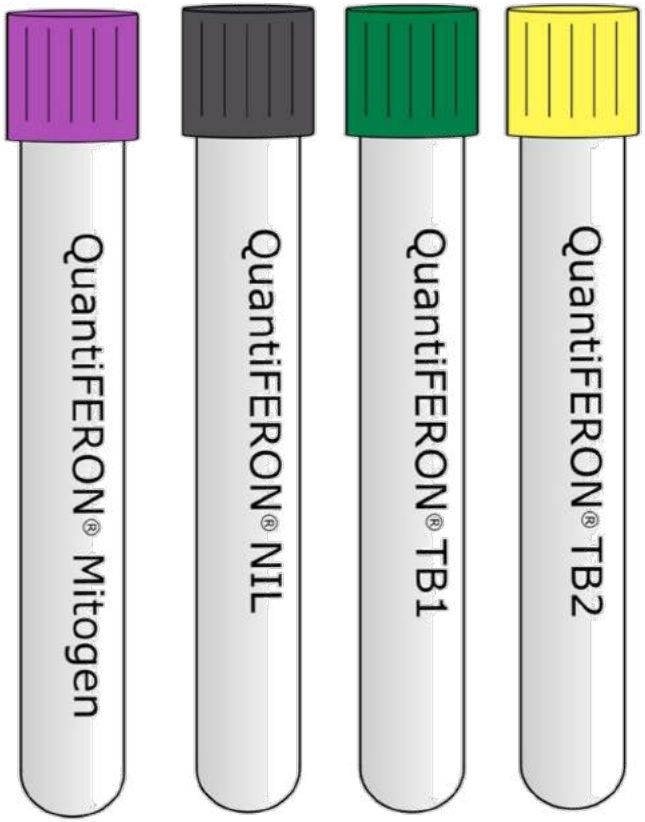
QFT does NOT react to BCG and most NTM!

Keterbatasan IGRA dan TST

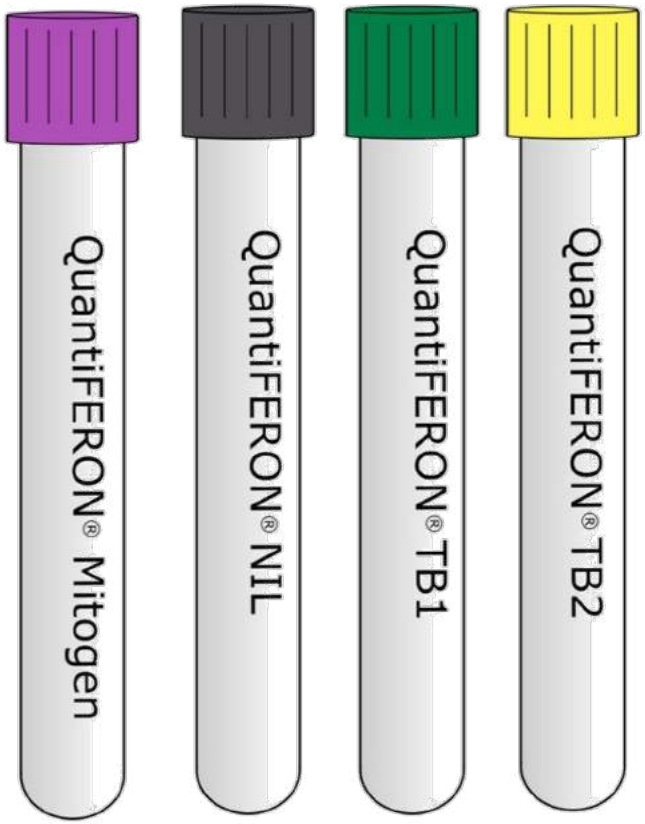
- **TIDAK BISA** membedakan TB aktif atau TB laten
- **TIDAK BISA** membedakan infeksi baru atau infeksi lama
- **TIDAK BISA** digunakan untuk menilai hasil pengobatan

WHO. *Guidelines on The Management of Latent Tuberculosis Infection*. 2018. Geneva, Switzerland.
http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21682en/s21682en.pdf
PDPI. Pedoman tatalaksana TB laten. 2016. Jakarta

Metode Pemeriksaan IGRA (PT UBC):
1. QuantiFERON Gold PLUS (QFT PLUS)



QFT-PLUS BLOOD COLLECTION TUBES



1 kit tabung QFT = 50 sampel
1 kit ELISA QFT = 2 plate = 42 sampel

Mitogen – Positive Control

Fungsi : Mengkonfirmasi status imun pasien, persiapan dan pengerjaan sampel

Nil – Negative Control

Fungsi: melihat *baseline* IFN-γ yg bisa meningkat krn sebab lain (bukan infeksi TB)

TB1 – Fungsi : Menstimulasi respon sel T-$CD4^+$ melepaskan IFN γ akibat infeksi TB

TB2 – Fungsi : Menstimulasi respon sel T-$CD4^+$ dan sel T sitotoksik $CD8^+$ melepaskan IFN γ akibat infeksi TB (isinya antigen ESAT6 dan CFP10, peptida)

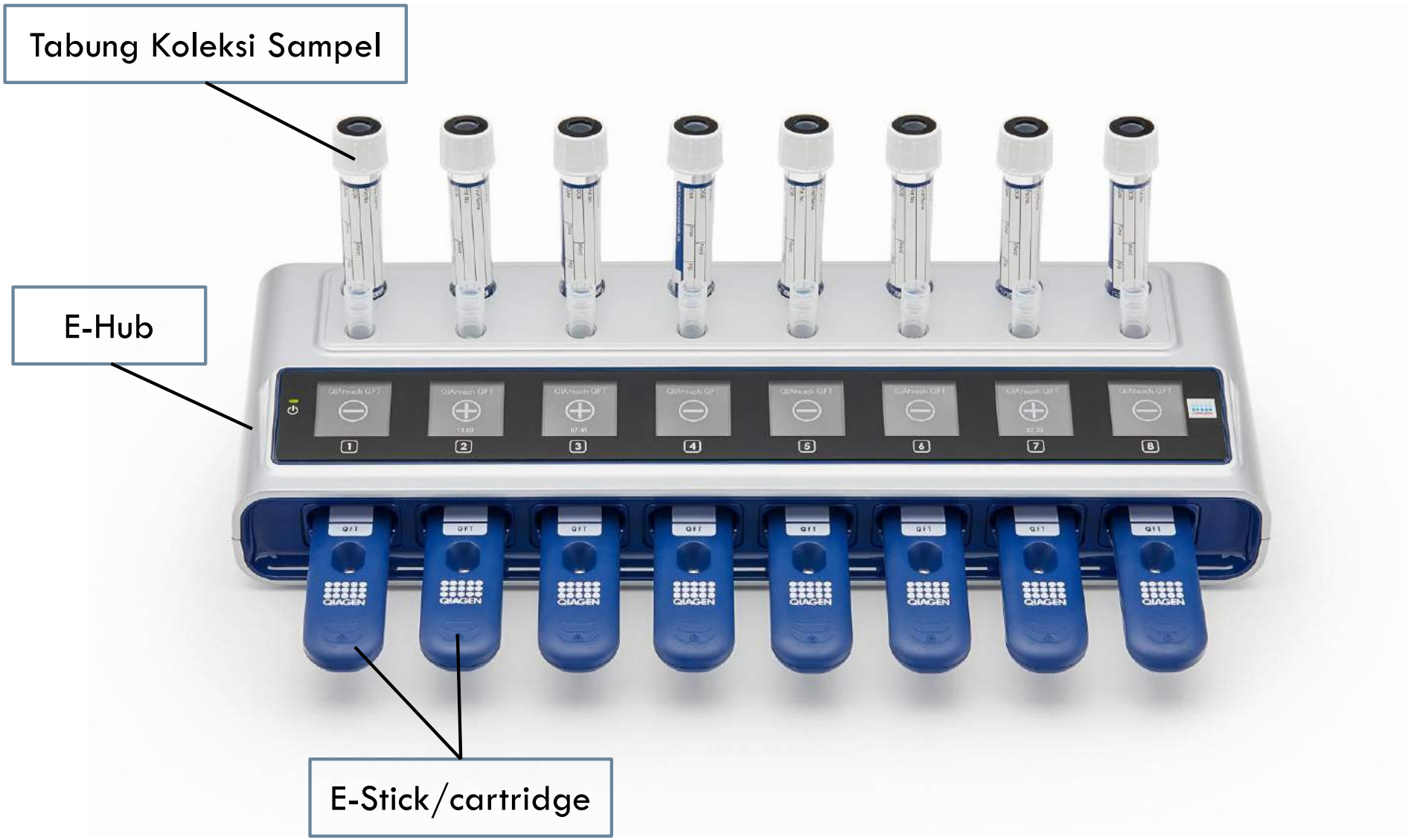
http://www.labor-lademannbogen.de/typo3conf/ext/llb_resources/Resources/Public/assets/img/materialanforderung/622222-big.jpg

Qiagen. QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) ELISA Package Insert. www.quantiferon.com/irm/content/PI/QFT/PLUS/2PK-Elisa/UK.pdf

WHO POLICY STATEMENT – IGRA (2022)

- QFT-PLUS
  - Sensitivitas 90.8% (95% CI: 80.0-96.1)
  - Mempunyai agreement yang baik dengan metode IGRA yang lain dengan Kappa Cohen statistic bervariasi dari 0.74 sampai 0.82
  - Mempunyai reprodusibilitas yang baik dengan Kappa Cohen statistic 0.90
- Kinerja QIAGEN QuantiFERON-TB Gold Plus sebanding dengan metode IGRA yang direkomendasikan WHO untuk mendeteksi infeksi TB.
- QIAGEN QuantiFERON-TB Gold Plus direkomendasikan WHO saat ini untuk deteksi ITBL.

2. QIAreach QuantiFERON TB



Prinsip Kerja alat (tabung dan eStick)

- Tabung koleksi sampel
  - mengandung antigen ESAT-6, CFP-10 dan peptide → Menstimulasi respon sel T-$CD4^+$ dan sel T sitotoksik $CD8^+$ untuk melepaskan IFN γ akibat infeksi TB
- eStick – Lateral Flow Immunofluoresence
  - mengandung antibodi spesifik berlabel fluorosen yang akan menangkap IFN γ yang ada di dalam sampel, intensitas cahaya flurosen yang muncul sebanding dengan banyaknya IFN γ yang ada di dalam sampel.

Regulasi Suhu pemeriksaan IGRA	Min °C	Max °C	Catatan
Berapa suhu penyimpanan tabung koleksi sampel jika belum digunakan?	4°C	25°C	
Pada suhu berapa tabung koleksi sampel ketika dilakukan pengambilan sampel darah?	17°C	25°C	Max. 16 jam
Pada suhu berapa tabung koleksi sampel diinkubasi?	36°C	38°C	37±1°C
Pada suhu berapa penyimpanan tabung koleksi sampel setelah dilakukan inkubasi? (sebelum dilakukan sentrifugasi)	4°C	27°C	Max 3 hari
Setelah sentrifugasi, pada suhu berapa tabung berisi plasma disimpan? Dan stabil untuk jangka waktu berapa lama?	2°C	8°C	28 hari

Qiagen. QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) ELISA Package Insert.
www.quantiferon.com/irm/content/PI/QFT/PLUS/2PK-Elisa/UK.pdf

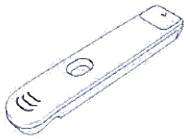
Detail Test kit dan alat (eHub)

Test kit (50 tests)

QIAreach QFT Blood Collection tube

Diluent Buffer

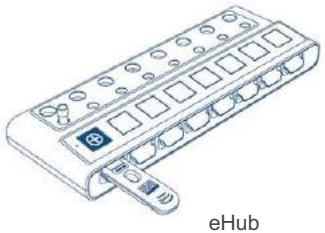
Processing Tube



eStick

- Time to results : 5–20 minutes
- 50 tests/kit
- Single use, disposal lateral flow cartridge (eStick)
- Used in conjunction with buffer and processing tube
- 27 embedded controls
- All results analyzed on eStick firmware and retained in cartridge memory

Power data & transfer

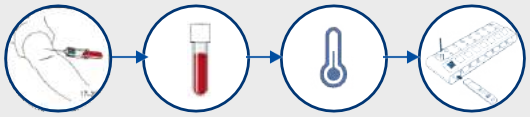


eHub

- Portable power source for eStick to display result
- Displays test result to user
- Contains battery for 8 hours remote use
- Scalable – simultaneous 8-patients tests/random access with option for more than 1 eHub per user
- No maintenance or calibration required
- True walkaway solution
- LIMS connectivity with optional software

Cara kerja QIAreach QFT

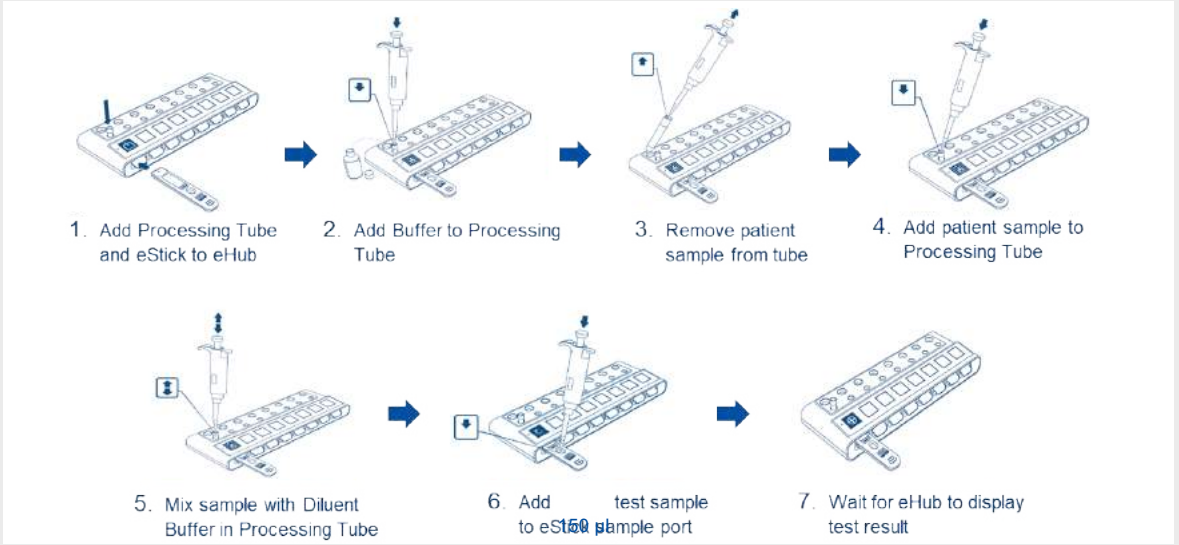
Pre-analytical sample collection



Material required and not provided

- Phlebotomy material for blood collection
- Incubator
- Pipettes

Analytical step : 5–20 minutes



- Flexible throughput – more than 24 patients/hour/eHub
- Ambient temperature stable reagents (2–30°C)

Quality control dan validasi

QIAreach QFT

- Di dalam setiap eStick/cartridge terdapat control yang ditanam (built in) untuk memastikan hasil valid.
- Hasil yang tidak valid atau control yang tidak berjalan akan memunculkan code error di software atau bacaan pada alat/eHub (interpretasi code error dapat dilihat di IFU).

Interpretasi hasil

Following sample addition: Test in process (with countdown timer)

Positive test results (with time countdown)

Negative test results

Interpretasi hasil IGRA

- **Positif**
  - Kemungkinan besar ADA infeksi *Mycobacterium tuberculosis*
  - Infeksi *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* (*positif palsu*)
- **Negatif**
  - Kemungkinan besar TIDAK ADA infeksi *M. tuberculosis*
  - Sebab : Respon imun belum terbentuk, paparan infeksi TB <8 minggu (negatif palsu)

Hasil Penelitian di FKUB/ RSSA Malang

- Subyek penelitian: terduga TB anak (poli dan IRNA)
- Penelitian bulan Desember-Februari 2022.
- Kriteria TB aktif: ditentukan oleh SpA, Konsultan Respirologi, bila didapatkan:
  1. Adanya batuk > 2mgg, atau demam tanpa sebab yang jelas > 2mgg, BB tidak naik/ turun dalam 2 bulan terakhir, didapatkan pembesaran KGB leher, atau fatigue.
  2. Foto thorax sugestif TB.
  3. Pemeriksaan mikrobiologi positif TB.

Hasil Penelitian

		TB aktif	TB laten	Bukan TB	Jumlah
IGRA	positif	16	2	0	18
	negatif	9	0	43	52
Total		25	2	43	70

Sensitifitas:
- ✓ TB Aktif: 64%
- ✓ TB laten: 100%

Spesifisitas:
- ✓TB Aktif: 100%
- ✓TB laten: 100%

PPV: 100%
NPV: 82,7%
Akurasi: 86,8%
LR (+): 100%
LR (-): 36%

		TB Aktif	TB Laten	Bukan TB	Jumlah
TST	positif	4	0	2	6
	negatif	17	2	45	64
Total		21	2	47	70

Sensitifitas:
- ✓ TB Aktif: 19%
- ✓ TB laten: tidak dapat dievaluasi

Spesifisitas:
- ✓TB Aktif: 95,7%
- ✓TB laten: 95,2%

PPV: 66,7%
NPV: 69,1%
Akurasi: 72%
LR (+): 44,18%
LR (-): 84,6%

- Dalam membantu diagnosis TB Anak, **performa IGRA QIAreach lebih baik** dibandingkan dengan TST.
- Performa IGRA QIAreach baik dalam diagnosis TB laten pada anak, (perlu penambahan jumlah subyek mengingat subyek TB laten sangat sedikit.)

		TB aktif	TB laten	Bukan TB	Jumlah
IGRA	positif	16	2	0	17
	negatif	9	0	43	52
Total		25	2	43	70

Sensitifitas:
- ✓ TB Aktif: 64%
- ✓ TB laten: 100%

Spesifisitas:
- ✓TB Aktif: 100%
- ✓TB laten: 100%

- Dalam menunjang Diagnosis TB Aktif, IGRA QIAreach QFT mempunya sensitivitas yang cukup, dengan spesifisitas 100%.
- IGRA tidak direkomendasikan untuk membedakan TB Aktif dengan TB laten (WHO policy statement, 2022).
- Tidak didapatkan hasil IGRA QIAreach QFT positif palsu pada subyek TB Anak.
- Terdapat 9 subyek TB aktif dengan hasil IGRA negatif, 6(70%) diantaranya berusia kurang dari 5 tahun→ sensitivitas IGRA QIAreach QFT menurun pada usia < 5 tahun.
- IGRA QIAreach QFT mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang sangat baik untuk diagnosis TB laten.

		TB aktif	TB laten	Bukan TB	Jumlah
Gene expert	positif	5	0	0	5
	negatif	15	2	41	56
Total		20	2	41	63

Sensitifitas:

- ✓ TB Aktif: 25%

Spesifisitas:

- ✓TB Aktif: 100%

- Sensitivitas Gene Expert yang rendah untuk diagnosis TB aktif pada anak, diduga disebabkan oleh:
  1. Jumlah MTb pada sputum sangat sedikit (paucybaciller)
  2. Kesulitan berdahak pada anak.
  3. Gejala TB paru pada anak tidak selalu batuk.

Kappa Agreement QIAreach QFT vs Gene Expert

- Kappa Cohen Statistic IGRA Qiarech dengan Gene Expert: 0,83%.
- → Hasil pengukuran IGRA QIAreach QFT menunjukkan konsistensi yang baik dengan hasil pengukuran Gene Expert.
- → Dapat menjadi alternatif pemeriksaan penunjang untuk TB Anak, walaupun tidak dapat menggantikan Gene Expert dan tidak dapat membedakan TB aktif dengan TB laten.
- → Kombinasi pemeriksaan IGRA QIAreach QFT dengan gejala TB dan foto thorax dapat membantu diagnosis TB Anak.

Keunggulan IGRA QIAreach QFT

1. Kemudahan alur kerja (POCT)
2. Hasil yang lebih cepat (20 menit)
3. Kebutuhan sampel lebih sedikit (1mL darah)
4. Kemudahan interpretasi hasil (tidak ada hasil indeterminate)
5. Peralatan sederhana (tidak perlu peralatan ELISA reader, washer, dan plate shaker)
6. Tidak perlu keterampilan khusus (assay ELISA)
7. Sampel yang dikerjakan dapat lebih banyak (24 tes/jam)

Perbandingan
QIAreach QFT-TB VS **QFT PLUS**

Profil QIAreach VS QFT-PLUS

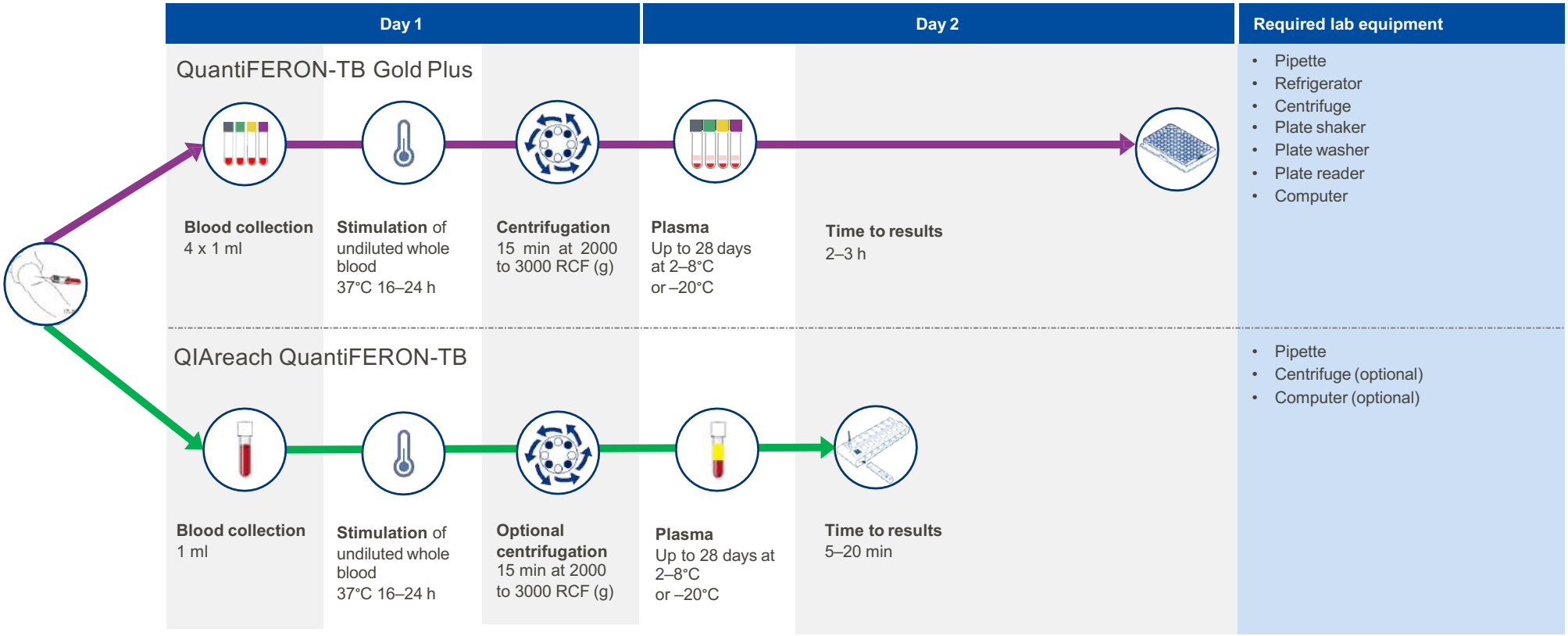
Table 1 Comparison of QIAreach QFT and QFT-Plus.

	QIAreach QFT	QFT-Plus
Volume of blood sample and tubes	1 mL, one tube	total 4 mL, four tubes (Nil, TB1, TB2, Mitogen, 1mL each)
Stimulation antigens	ESAT-6 + CFP-10+ short peptide CFP-10	TB1: ESAT-6 + CPF-10 TB2: ESAT-6 + CPF10+short peptide CFP-10
Incubation time	16-24 h	16-24 h
Principle of IFN-γ detection	Digital fluorescence lateral flow nanoparticle technology	Enzyme-linked immunoassay; ELISA (colorimetric) system
IFN-γ measurement time and number of samples	Max 20 min/test, 8 tests/eHub	At least 150 min/test 44 samples/kit, 22 samples/plate
Data management	Laptop PC/QIAreach software	ELISA workstation/QFT-Plus software
Instruments for assay	Incubator/centrifuge (not always necessary), eHub	Workstation (plate washer/plate reader)/incubator/centrifuge
Power supply	USB or 100 ~240 volt	100 ~240 volt
Assay handling	Easy	Moderate
Cut-off value	N/A	TB2 (or TB1)-Nil 0.35IU/mL

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; ESAT-6: early secretory antigenic 6 kDa; CFP-10: culture filtrate protein 10.

Result Interpretation	Positive and Negative	Positive, Negative, and Indeterminate

Alur kerja QIAreach VS QFT PLUS



Take home messages

1. QIAreach merupakan bentuk *point of care test* (POCT) dari IGRA test
2. Kombinasi pemeriksaan IGRA QIAreach QFT dengan gejala TB dan foto thorax dapat membantu diagnosis TB Anak.
3. QIAreach mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang sangat baik untuk diagnosis TB laten dan cocok digunakan sebagai alat skrining TB massal di area pedalaman dengan keterbatasan sumber daya.
4. QIAreach lebih unggul dibandingkan dengan TST dalam diagnosis TB Anak.
5. Persamaan QIAreach dan QFT PLUS:
    1. Menggantikan peran Mantoux/Tuberkulin Skin Test dalam diagnostik TB laten.
    2. Menggunakan sampel darah/plasma
6. Keunggulan QIAreach dibandingkan QFT PLUS:
    1. Kemudahan alur kerja
    2. Hasil yang lebih cepat (20 menit)
    3. Kebutuhan sampel lebih sedikit (1mL darah)
    4. Kemudahan interpretasi hasil (tidak ada hasil indeterminate)
    5. Peralatan sederhana (tidak perlu peralatan ELISA reader, washer, dan plate shaker)
    6. Tidak perlu keterampilan khusus (assay ELISA)
    7. Sampel yang dikerjakan dapat lebih banyak (24 tes/jam)

TERIMA KASIH