

Urszula Demkow

Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie
 Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej WUM

Komentarz do pracy K. Kruczak i E. Nizankowskiej-Mogilnickiej: „Nowe możliwości diagnostyki utajonego zakażenia prątkiem gruźlicy”

Commentary to the article of K. Kruczak and E. Nizankowska-Mogilnicka:
 „The new diagnostic methods of latent tuberculosis infection”

Pneumonol. Alergol. Pol. 2008; 76: 468–471

Naturalny przebieg gruźlicy składa się z trzech etapów: ekspozycji, zakażenia i aktywnej choroby. Po kontakcie z prątkami gruźlicy jedynie część ekspozowanych osób ulega zakażeniu. Za ukryte zakażenie prątkiem gruźlicy przyjmuje się takie, które nie powoduje żadnych objawów klinicznych, radiologicznych ani bakteriologicznych. Odsetek zakażonych jest trudny do oszacowania, wiadomo jednak, że zależy on od masywności narażenia, zjadliwości szczepu prątka, czasu i bliskości kontaktu z chorym oraz od stanu mechanizmów obronnych osoby narażonej. Związek pomiędzy zakażeniem pierwotnym a późniejszym zachorowaniem nadal nie jest do końca wyjaśniony. Już kilkadziesiąt lat temu na podstawie danych sekcyjnych i długoletnich obserwacji klinicznych odkryto podstawowe i unikalne zjawisko w epidemiologii gruźlicy, polegające na ogromnej dysproporcji pomiędzy zakażeniem a zachorowaniem. Dowiedziono, że nawet przy dużym rozpowszechnieniu zakażeń u większości zakażonych nie występują żadne objawy choroby. Ocenia się, że u osób z latentną postacią gruźlicy, przy braku innych czynników ryzyka, roczne prawdopodobieństwo reaktywacji wynosi jedynie 0,1%, co przy ekstrapolacji można oszacować jako życiowe ryzyko rozwoju choroby równe 5–10%.

Częstość występowania zakażenia prątkiem w danej populacji zależy od wielu złożonych czynników, w tym od tego, czy gruźlica występuje na danym terenie sporadycznie, endemicznie czy epidemicznie, od struktury wieku danej społeczności, od warunków socjalno-ekonomicznych, geograficznych, klimatycznych itp. Osoby zakażone prątkiem

stanowią pulę, z której przez wiele lat będą się wywodzić nowe przypadki zachorowania na gruźlicę. Dlatego przy podobnym ryzyku zachorowania w krajach, w których odsetek populacji zakażonej jest wysoki, bezwzględna liczba zachorowań będzie wyższa niż w krajach, w których odsetek ten jest niższy.

Eliminacja ukrytego zakażenia, z którego wywodzi się większość przypadków aktywnej choroby, jest celem programów zwalczania gruźlicy w krajach o niskiej zapadalności (Stany Zjednoczone, kraje Europy Zachodniej). W 2002 roku opracowano rekomendacje dotyczące zwalczania i eliminacji gruźlicy w krajach o małej zapadalności, opracowane przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, *World Health Organization*), Międzynarodową Unię Przeciwgruźliczą (IUATLD, *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*) oraz grupę roboczą Królewskiego Towarzystwa Gruźlicy (*Royal Tuberculosis Association Working Group*). W krajach o niskiej zapadalności metodą zapobiegania rozwojowi gruźlicy jest profilaktyczne leczenie osób z ukrytym zakażeniem prątkiem. Dotyczy to szczególnie osób obciążonych dużym ryzykiem zachorowania, a więc niedawno zakażonych, będących w bliskim kontakcie z chorym prątkującym, zakażonych wirusem HIV i osób z uprzednio nieleczonymi zmianami włóknistymi w szczytach płuc. Kraje o niskiej zapadalności prowadzą rygorystyczne badanie kontaktów i profilaktyczne leczenie osób zakażonych. Polega ono na stosowaniu izoniazydu przez 6 miesięcy. Chemioprofilaktyka wtórna jest stosowana w Polsce u dzieci i młodzieży z intensywnym dodatnim odczynem

tuberkulinowym, a zwłaszcza z konwersją odczynu tuberkulinowego, mających styczność z chorym prątkującym, bez zmian radiologicznych. Wskazania do zastosowania chemioprophylaktyki rozpatruje się indywidualnie w zależności od wieku, stanu ogólnego, stopnia ekspozycji na zakażenie, a opinie co do celowości takiego postępowania są podzielone.

Kruczak i Niżankowska-Mogilnicka [1] poruszają bardzo istotny problem wykrywania utajonego zakażenia prątkiem. Autorki zauważają, że od wielu lat jednym z istotnych elementów postępowania kwalifikacyjnego do wtórnej chemioprophylaktyki gruźlicy, zarówno w Polsce, jak i na świecie, jest wynik testu tuberkulinowego. Odczyn tuberkulinowy to naciek komórkowy obserwowany w miejscu wprowadzenia do uczulonego organizmu mieszaniny natywnych i słabo zdefiniowanych antygenów prątka gruźlicy pod postacią tuberkuliny. Wynik testu (wielkość nacieku) uważany jest za miarę odpowiedzi komórkowej na antygeny prątka. Ze względu na podobieństwo antygenowe zachodzące pomiędzy różnymi gatunkami prątków, dodatni wynik odczynu tuberkulinowego może wynikać z reakcji krzyżowych pomiędzy antygenami prątka gruźlicy obecnymi w tuberkulinie a antygenami niepatogennych prątków obecnych w środowisku człowieka. Autorki pracy słusznie zauważają, że w populacji szczepionej BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) dodatni wynik próby tuberkulinowej może być wyrazem odpowiedzi anamnesticznej na antygeny szczepu BCG. Test tuberkulinowy, chociaż powszechnie stosowany, nie może być uznany za idealną metodę wykrywania zakażenia prątkiem gruźlicy także w populacjach nieszczepionych. Czynniki, które mogą hamować reakcję na tuberkulinę lub wpływać na jej wygaśnięcie, to ciężki stan ogólny, choroby nowotworowe, choroby zakaźne (zwłaszcza odra, ospa, różyczka), leczenie lekami immunosupresyjnymi i cytostatykami, niedoczynność tarczycy, cukrzyca, niewydolność nerek. Powyższe ograniczenia, a także subiektywność wykonania i odczytu testu wpływają na jego niską czułość i swoistość. Należy również podkreślić, że w gruźlicy, podobnie jak w innych chorobach ziarniniakowych, obserwuje się kompartmentalizację odpowiedzi komórkowej. Polega ona na przesunięciu komórek układu odpornościowego (głównie limfocytów T) z obwodu do miejsca przebiegu odpowiedzi immunologicznej. Zaawansowane postacie gruźlicy są również powiązane z układową immunosupresją. Z powyższych powodów odczyn tuberkulinowy może nie w pełni odzwierciedlać status immunologiczny badanej osoby.

Zasadniczym celem pracy Kruczak i Niżankowskiej-Mogilnickiej jest przedstawienie nowych metod wykrywania zakażenia prątkiem gruźlicy. Nowe testy diagnostyczne opierają się na ocenie uwalniania interferonu γ (INF- γ) przez pobudzone swoistymi antygenami prątka leukocyty krwi obwodowej człowieka. Autorki pracy opisują 2 kategorie testów opartych na ocenie produkcji interferonu γ różniących się metodyką wykonania. Pierwsza kategoria to testy polegające na ocenie ilości uwalnianego interferonu w krótkotrwałych hodowlach komórek pełnej krwi stymulowanych antygenami prątka (QuantiFERON-TBGGold). Testy drugiego typu polegają na liczeniu komórek produkujących interferon po stymulacji (T-SPOT.TB). Oba testy oparte są na rekombinowanych proteinach *M. tuberculosis*. Należą do nich ESAT-6 (*early secreted antigenic target 6kDa*) i CFP-10 (*culture filtrated protein*). Oba antygeny są współwydzielane w ilościach 1:1 w krótkotrwałych hodowlach prątków. Zarówno ESAT-6, jak i CFP-10 to antygeny o małej masie cząsteczkowej, preferencyjnie rozpoznawane i będące głównymi stymulatorami produkcji INF- γ we wczesnych fazach eksperymentalnego zakażenia prątkiem. Oba antygeny występują na tym samym operonie, pozostają pod kontrolą tego samego promotora i są aktywnie wydzielane przez *M. tuberculosis*, po czym formują dimer. I chociaż są to 2 oddzielne polipeptydy, są jednak prezentowane komórkom układu odpornościowego w ilościach równomolarnych i w tym samym czasie, a więc mogą być traktowane jako jeden antygen. Ograniczona różnorodność repertuaru limfocytów T we wczesnym okresie zakażenia warunkuje wysoką czułość testów opartych na powyższych antygenach. W późniejszych fazach zakażenia odpowiedź immunologiczna limfocytów jest bardziej heterogenna, a więc reakcja na te antygeny może być słabsza. Zatem testy oparte na powyższych antygenach mogą być przydatne do wykrywania zakażenia prątkiem we wczesnej fazie, jeszcze przed rozwojem aktywnej, klinicznie jawnej postaci choroby. Odpowiedź na ESAT-6 i CFP-10 jest komplementarna, dlatego celowa jest ocena odpowiedzi na oba antygeny. Autorki pracy podkreślają wysoką swoistość testów opartych na obu powyższych antygenach. Słuszna jest również uwaga auterek na temat braku reakcji krzyżowych z bakteriami szczepu BCG oraz większością mykobakterii środowiskowych, obiektywna i ilościowa metoda diagnostyczna oraz możliwość częstego powtarzania oznaczenia przy braku efektu *booster*, co decyduje o przewadze testu uwalniania interferonu nad testem tuberkulinowym. Należałoby natomiast zwrócić uwagę na stymulację produkcji inter-

feronu γ ocenianego dowolną metodą IGRA (*interferon gamma release assays*) pod wpływem wcześniej wykonanej próby tuberkulinowej. Tuberkulina (w przeciwieństwie do szczepionki BCG) zawiera antygeny ESAT-6 i CFP-10. Wyniki przeprowadzonych ostatnio badań wykazały, że pobudzenie produkcji interferonu w tym układzie trwa około 6 miesięcy. Dlatego najlepiej pobierać krew do badania IGRA przed wykonaniem próby tuberkulinowej. W przypadku wcześniejszego wykonania próby tuberkulinowej wyniki testu IGRA mogą być niewiarygodne.

Autorki pracy [1] podkreślają istotne zalety testów IGRA, jakimi są: stosunkowo niska cena, niewielka pracochłonność, konieczność jednorazowej wizyty chorego oraz redukcja błędów wynikających z subiektywności wykonania i odczytu. Przedstawiają również metodykę wykonania obu testów. Należy podkreślić niezwykłą wrażliwość limfocytów produkujących interferon na warunki zewnętrzne (sposób pobrania, przechowywania i transportu krwi, czas inkubacji, warunki wirowania i przechowywania nadsącza), a także znaczenie właściwego odczytu wyniku testu ELISpot oraz interpretacje wyników w kontekście kontroli dodatniej i ujemnej. Dlatego w międzynarodowych rekomendacjach zaleca się wykonywanie testów przez wykwalifikowanego, przygotowanego merytorycznie personel, z zachowaniem zasad dobrej praktyki laboratoryjnej.

Istotnym zagadnieniem przedstawionym krótko przez autorki pracy są międzynarodowe rekomendacje dotyczące stosowania testów IGRA. Najwcześniej opublikowano rekomendacje amerykańskie opracowane przez *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC). Jak autorki słusznie zauważają, Amerykanie zalecają stosowanie IGRA w następstwie testu tuberkulinowego we wszystkich sytuacjach, kiedy poszukuje się ukrytego zakażenia prątkiem. Podobne są wytyczne japońskie. Rekomendacje brytyjskie, szwajcarskie i niemieckie zalecają wykonanie IGRA u osób z dodatnim wynikiem testu tuberkulinowego. Należy jednak podkreślić, że w żadnym przypadku nie zaleca się testowania całej populacji, lecz skrining celowany w grupach podwyższonego ryzyka zakażenia. Nowe testy nie zmieniają zasad celowanego skriningu, natomiast powinny zwiększyć dokładność wykrywania osób zakażonych. Koszty programów zdrowia publicznego są niższe w wypadku zastosowania IGRA zamiast OT, a także w przypadku algorytmu dwustopniowego. Dokładniejsza diagnostyka i celowana profilaktyka obniżają koszty programów zwalczania gruźlicy.

Jak słusznie zauważają autorki pracy, swoistość testów IGRA jest wyższa niż testu tuberkulinowego. Dane co do czułości bywają natomiast

rozbieżne. Generalnie, czulsze są testy oparte na technice ELISpot, czyli polegające na bezpośrednim zliczaniu komórek produkujących interferon w odpowiedzi na stymulację swoistą. Należy pamiętać, że testy IGRA oparte są na antygenach „wczesnych”, tzn. wydzielanych w pierwszej fazie zakażenia. Istnieją przesłanki teoretyczne wskazujące, że w miarę trwania zakażenia testy IGRA mogą być mniej czułe niż OT, w którym stosuje się mieszaninę wielu antygenów. To, co jest zaletą testów IGRA, w pewnych sytuacjach może stać się ich ograniczeniem. Na pewno problem ten wymaga dalszych pogłębionych badań.

Kruczak i Niżankowska-Mogilnicka słusznie zauważają, że oba typy testów opierają się na odpowiedzi komórkowej i dlatego mogą być nieprzydatne w diagnostyce osób w immunosupresji. Problem ten również wymaga dalszych badań. Niektórzy autorzy szeroko zakrojonych badań w populacjach zakażonych wirusem HIV posuwają się nawet do twierdzenia, że w tych przypadkach testy IGRA nie będą przydatne.

Bardzo trudnym problemem jest również diagnostyka ukrytego zakażenia prątkiem u dzieci. Ryzyko przejścia ukrytego zakażenia w aktywną postać gruźlicy jest u dzieci wielokrotnie wyższe niż u dorosłych. Życiowe ryzyko rozwoju gruźlicy u zakażonej osoby dorosłej wynosi około 5–10%, natomiast u niemowląt około 50%, u dzieci w wieku 1–5 lat — 24%, a u nastolatków — 15%. Na ogół dziecko zaraża się gruźlicą w wyniku kontaktu z osobą prątkującą w najbliższym otoczeniu (rodzina, szkoła). W większości przypadków progresja do aktywnej postaci choroby dokonuje się w ciągu roku od zakażenia. U zakażonego dziecka poniżej 2. roku życia istnieje wysokie prawdopodobieństwo rozwoju ciężkiej postaci gruźlicy (postać rozsiana, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych). *American Academy of Pediatrics* (AAP) zaleca aktywne poszukiwanie kontaktów, chemioprophylaktykę u dzieci zakażonych prątkiem i leczenie dzieci z aktywną postacią choroby jako integralną część programu zwalczania gruźlicy na świecie. Wczesne rozpoznanie zakażenia prątkiem u dziecka zapewnia możliwość skutecznej prewencji rozwoju aktywnej gruźlicy i jej ciężkich postaci. W piśmiennictwie światowym niewiele badań dotyczy gruźlicy dziecięcej. W krajach, gdzie gruźlica u dzieci występuje często, brakuje środków na badania naukowe, natomiast w krajach rozwiniętych, ze względu na malejącą liczbę przypadków, gruźlica u dzieci nie była uznawana za problem priorytetowy. Do chwili obecnej bardzo mało opracowań naukowych dotyczyło zastosowania testu uwalniania interfero-

nu γ u dzieci oraz oceny wpływu takich czynników, jak stan odżywienia, wiek dziecka, obecność innych chorób współistniejących na wyniki testu. Zakażenie prątkiem u dziecka jest dowodem na obecność świeżej transmisji zakażenia w jego otoczeniu i powinno prowadzić do poszukiwania osoby dorosłej prątkującej, która była źródłem zakażenia. Testy oparte na uwalnianiu interferonu γ mogą być potencjalnie bardzo wartościowym narzędziem diagnostycznym.

Ze względu jednak na stosunkowo niewielkie jeszcze doświadczenie kliniczne w zastosowaniu testu QuantiFERON, ogromną heterogenność odpowiedzi immunologicznej na antygeny prątka oraz różnorodność wpływów genetycznych i środowiskowych na przebieg zakażenia, konieczne jest przeprowadzenie szeroko zakrojonych badań obejmujących różne populacje. Celowe jest zwłaszcza przebadanie grup podwyższonego ryzyka zakażenia oraz osób, u których obecność zakażenia wiąże się ze zwiększonym ryzykiem przejścia w aktywną postać choroby. Do grup podwyższonego ryzyka należą pracownicy służby zdrowia (szczególnie pracownicy laboratoriów prątka), u których, ze względu na zwiększoną częstość oraz masowość i długotrwałość ekspozycji, częściej dochodzi do zakażenia prątkiem, a zapadalność na gruźlicę jest wysoka. Zwiększone ryzyko zakażenia występuje również u osób bezdomnych, więźniów i personelu więzień, osób z obniżoną odpornością (w tym zakażonych wirusem HIV), osób (zwłaszcza dzieci) pozostających w bliskim kontakcie z chorymi prątkującymi.

Piśmiennictwo

- Kruczak K., Niżankowska-Mogilnicka E. Nowe możliwości diagnostyki utajonego zakażenia prątkiem gruźlicy. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2008; 76: 446–450.
- Kuś J. Gruźlica — sytuacja epidemiologiczna oraz współczesne poglądy na leczenie i zapobieganie. *Terapia i Leki* 2002; XXX/LII/5–6: 26–29.
- Roszkowski K., Szczuka I. Epidemiologia gruźlicy. *Terapia* 2004; 2: 57–58.
- Broekmans J.F., Migliori G.B., Rieder H.L. European framework for tuberculosis control and elimination in countries with a low incidence. *Eur. Respir. J.* 2002; 19: 765–775.
- Schwartzman K. Latent tuberculosis infection: old problem, new priorities. *Canadian Medical Association Journal* 2002; 166: 756–761.
- Mazurek G.H., LoBue P.A., Daley C.L. i wsp. Comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing for detecting latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *JAMA* 2001; 286: 1740–1747.
- Mazurek G.H., Villarino M.E. Guidelines for using the QuantiFERON-TB test for diagnosing latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Morb. Mortal. Wkly. Rep. Recomm. Rep.* 2003; 52: 15–18.
- Doherty T.M., Demissie A., Olobo J. i wsp. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis* — specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 704–706.
- Styblo K. The relationship between the risk of tuberculosis infection and the risk of developing infectious disease. *Bull. Int. Union Tubec.* 1985; 60: 117–119.
- Nienhaus A., Schablon A., Diel R. Interferon-gamma release assay for the diagnosis of latent TB infection — analysis of discordant results, when compared to the tuberculin skin test. *PLoS ONE.* 2008; 3: e2665.
- Ruhwald M., Petersen J., Kofoed K. i wsp. Improving T-cell assays for the diagnosis of latent TB infection: potential of a diagnostic test based on IP-10. *PLoS ONE.* 2008; 3: e2858.
- Leyten E.M., Arend S.M., Prins C., Cobelens F.G., Ottenhoff T.H., van Dissel J.T. Discrepancy between *Mycobacterium tuberculosis* — specific gamma interferon release assays using short and prolonged *in vitro* incubation. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007; 14: 880–885.
- Prevention and control of tuberculosis in correctional and detention facilities: recommendations from CDC. Endorsed by the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis, the National Commission on Correctional Health Care, and the American Correctional Association. *MMWR Recomm. Rep.* 2006; 55: 1–44.
- Prevention Committee, Japan Tuberculosis Scientific Society. *Kekkaku* 2006; 81: 393–397.
- Swiss Lung League. Detection of Latent Tuberculosis Using a Blood Test. Berna. Swiss Federal Office of Public Health 2005.
- National Institute of Health and Clinical Excellence, www.nice.org.uk/CG033.
- Diel R., Nienhaus A., Lange C., Meywald-Walter K., Forßbohm M., Schaberg T. Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res.* 2006; 7: 77.
- Diel R., Nienhaus A., Lange C., Schaberg T. Cost-optimisation of screening for latent tuberculosis in close contacts. *ERJ* 2006; 28: 35–44.