

**Urszula Demkow**

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Urszula Demkow

## Testy uwalniania interferonu gamma nowym narzędziem do wykrywania ukrytego zakażenia prątkiem gruźlicy

Interferon gamma based tests as a new tool in diagnosis of latent tuberculosis

Pneumonol. Alergol. Pol. 2011; 79, 4: 261–263

Mimo znaczącego postępu w dziedzinie diagnostyki i leczenia, gruźlica nadal pozostaje ogromnym problemem zdrowotnym i społecznym [1–5]. Według szacunkowych danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) około 2 miliardy ludzi jest zakażonych prątkiem gruźlicy [1, 5]. Rocznie stwierdza się około 8 milionów nowych zachorowań (w tym 1,5 miliona dzieci) i 3 miliony zgonów (500 000 dzieci) [1, 5]. Rozprzestrzenianie się zakażenia wirusem HIV oraz czynniki społeczno-ekonomiczne (bezdomność, niedożywienie, narkomania, ruchy migracyjne) powodują wzrost liczby zachorowań [1, 5–8].

Choć zapadalność na gruźlicę w Polsce jest znacznie niższa niż w krajach Afryki czy Azji Południowo-Wschodniej, to jednak od wielu lat posiadamy jedno z najgorszych wskaźników epidemiologicznych w Europie [2, 3, 7].

Naturalny przebieg gruźlicy składa się z trzech etapów: ekspozycji, zakażenia i aktywnej choroby [7, 8]. Po kontakcie z prątkami gruźlicy jedynie część eksponowanych osób ulega zakażeniu [2, 7, 8]. Za ukryte zakażenie prątkiem gruźlicy przyjmuje się takie, które nie powoduje żadnych objawów klinicznych, radiologicznych ani bakteriologicznych [9]. Ocenia się, że spośród 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 oceniane na 10% [7, 8, 10].

Osoby zakażone prątkiem stanowią grupę, z której jeszcze przez wiele lat będą powstawać nowe przypadki zachorowania na gruźlicę [7]. Kraje o niskiej zapadalności prowadzą rygorystyczne badanie kontaktów i profilaktyczne leczenie osób zakażonych [9, 10].

Jednym z istotnych elementów postępowania kwalifikacyjnego do chemioprophylaktyki gruźlicy zarówno w Polsce, jak i na świecie jest wynik testu tuberkulinowego [7, 8, 11]. Jednak istotnym ograniczeniem tej metody diagnostycznej jest jej niska swoistość u osób szczepionych BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) gdyż dodatni wynik próby tuberkulinowej może być w takiej populacji wyrazem odpowiedzi anamnesticznej na antygeny szczepu BCG [12–14]. Ponadto, ze względu na podobieństwo antygenowe zachodzące między różnymi gatunkami prątków, dodatni wynik odczynu tuberkulinowego może wynikać z obecności reakcji krzyżowych między antygenami prątka gruźlicy obecnymi w tuberkulinie a antygenami niepatogennych prątków obecnych w środowisku człowieka [12, 15].

W ostatnich latach opracowano nową metodę identyfikacji osób zakażonych w stadium latencji, jeszcze przed rozwojem aktywnej postaci choroby [10, 16–20]. Nowe testy diagnostyczne oparte są na ocenie uwalniania interferonu gamma (INF $\gamma$ , *inter-*

**Adres do korespondencji:** prof. dr hab. n. med. Urszula Demkow, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej, ul. Marszałkowska 24, 00–576 Warszawa, e-mail: demkow@litewska.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 11.05.2011 r.  
Copyright © 2011 Via Medica  
ISSN 0867–7077

*feron gamma*) przez pobudzone swoistymi antygenami prątka leukocyty krwi obwodowej człowieka (IGRA, *interferon gamma release assays*) [17–19].

Opracowano dwie kategorie testów IGRA różniących się metodyką wykonania:

- test polegający na ocenie ilości uwalnianego interferonu w krótkotrwałych hodowlach komórek pełnej krwi stymulowanych antygenami prątka (Quantiferon-TB Gold — Cellestis);
- test polegający na liczeniu komórek produkujących interferon po stymulacji (T-spot-TB — Oxford Immunotec).

Do konstrukcji obu rodzajów testu IGRA zastosowano antygeny prątka *Mycobacterium tuberculosis* — *early secreted antigenic target 6kDa* (ESAT-6) i *culture filtrated protein* (CFP-10) [21–28]. Oba antygeny są współwydzielane w ilościach 1:1 w krótkotrwałych hodowlach prątków [23]. Antygeny ESAT-6 oraz CFP-10 są kodowane przez geny regionu RD-1 nieobecnego we wszystkich podtypach szczepu BCG oraz u większości prątków niegruźliczych (za wyjątkiem *M. szulgai*, *M. marinum* i *M. kansasii*) [13, 27, 28]. Homolog antygeny ESAT-6 istnieje u prątków trądu (*M. leprae*), jakkolwiek mimo 36-procentowej homologii można się spodziewać reakcji krzyżowych w krajach, gdzie występuje zakażenie trądem. Zarówno ESAT-6, jak i CFP-10 są antygenami o małej masie cząsteczkowej, preferencyjnie rozpoznawanymi i będącymi głównymi stymulatorami produkcji INF- $\gamma$  we wczesnych fazach eksperymentalnego zakażenia prątkiem [29, 30]. 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 stanowią dwa oddzielne polipeptydy, są jednak prezentowane komórkom układu odpornościowego w ilościach równomolarnych i w tym samym czasie, dlatego mogą być traktowane jako jeden antygen. Ograniczona różnorodność repertuaru limfocytów T we wczesnym okresie zakażenia warunkuje wysoką czułość testów opartych na powyższych antygenach [22, 23]. W późniejszych fazach zakażenia odpowiedź immunologiczna limfocytów jest bardziej heterogenna, a więc reakcja na te antygeny może być słabsza [22, 29, 30]. Zatem testy oparte na nich mogą być przydatne do wykrywania zakażenia prątkiem we wczesnej fazie, jeszcze przed rozwojem aktywnej, klinicznie jawnej postaci choroby [29, 30]. Odpowiedź na ESAT-6 i CFP-10 jest komplementarna, dlatego celowa wydaje się ocena odpowiedzi na oba antygeny [21, 22]. Z dostępnego piśmiennictwa wynika, że przydatność diagnostyczna testów opartych

na obu powyższych antygenach do wykrywania zakażenia prątkiem gruźlicy jest bardzo wysoka, ich swoistość wynosi 90–99%, a czułość szacuje się na około 72–97% [13, 20, 24–28]. Brak reakcji krzyżowych z bakteriami szczepu BCG oraz z większością mykobakterii środowiskowych, obiektywna i ilościowa metoda diagnostyczna oraz możliwość częstego powtarzania oznaczenia przy braku efektu *booster* decydują o przewadze testu uwalniania interferonu nad testem tuberkulinowym [13, 17–19, 27, 28]. Walorem testu jest także jego stosunkowo niska cena, niewielka pracochłonność, konieczność jednorazowej wizyty chorego oraz redukcja błędów wynikających z subiektywności wykonania i odczytu [18].

Wprowadzenie testów IGRA opartych na antygenach, które nie występują u szczepu BCG umożliwia odróżnienie odczynowości poszczepiennej od wywołanej utajonym zakażeniem gruźlicą. Test ten stwarza unikalną możliwość określenia w sposób bezpośredni obecności zakażenia *M. tuberculosis* w populacji, w której szczepienie przeciwko gruźlicy jest powszechnie stosowane, co może ułatwić klinicytom podjęcie decyzji o wprowadzeniu lub zaniechaniu chemioprophylaktyki gruźlicy u osób szczepionych BCG.

Jednak ze względu na stosunkowo niewielkie jeszcze doświadczenie kliniczne w zastosowaniu testów IGRA, 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.

W bieżącym numerze „Pneumonologii i Alergologii Polskiej” prezentujemy pracę Borkowskiej i wsp. [31], którzy badali wartość interferonowego testu T-spot-TB w grupie 137 osób pozostających pod opieką Przychodni Przyklinikowej Instytutu Gruźlicy Chorób Płuc w Warszawie oraz zdrowych pracowników laboratorium szpitalnego.

## Piśmiennictwo

1. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1991; 72: 1–3.
2. Kuś J. Gruźlica — sytuacja epidemiologiczna oraz współczesne poglądy na leczenie i zapobieganie. *Terapia i Leki* 2002; 5–6: 26–29.
3. Zwolska Z. Tuberculosis in the world and in Poland at the 20<sup>th</sup> century. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences, Biological Sciences* 1996; 44: 261–271.
4. Ziment I. Epidemiology of mycobacterial infection today. *Eur. Respir. Rev.* 1995; 5: 91–97.
5. World Health Organization: Global tuberculosis control. WHO Report 2001. WHO/CDS/TB/2001.287, Geneva 2001.
6. Szczuka I. Gruźlica i choroby układu oddechowego w Polsce w 2002 roku. *Biuletyn Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc*, Warszawa 2003.
7. Roszkowski K., Szczuka I. Epidemiologia gruźlicy. *Terapia* 2004; 2: 57–58.
8. Ziarski M. Epidemiologia gruźlicy. *Wyd. Lek. PZWL*, Warszawa 1958.

9. 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.
10. Schwartzman K. Latent tuberculosis infection: old problem, new priorities. *Cand. Med. Assoc. J.* 2002; 166: 756–761.
11. Weis S. Contact investigations: how do they need to be designed for the 21<sup>st</sup> century? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 166: 1016–1017.
12. Huebner R.E., Schein M.F., Bass J.B. Jr. The tuberculin skin test. *Clin. Infect. Dis.* 1993; 17: 968–997.
13. Johnson P.D., Stuart R.L., Grayson M.L. i wsp. Tuberculin-purified protein derivative-, MPT-64-, and ESAT-6-stimulated gamma interferon responses in medical students before and after *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and in patients with tuberculosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999; 6: 934–937.
14. Menzies R., Vissandjee B., Rocher I., St Germain Y. The booster effect in two-step tuberculin testing among young adults in Montreal. *Ann. Intern. Med.* 1994; 120: 190–198.
15. Desem N., Jones S.L. Development of a human gamma interferon enzyme immunoassay and comparison with tuberculin skin testing for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998; 5: 531–553.
16. Katial R.K., Hershey J., Purohit-Seth T. i wsp. Cell-mediated immune response to tuberculosis antigens: comparison of skin testing and measurement of *in vitro* gamma interferon production in whole-blood culture. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8: 339–345.
17. 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.
18. Mazurek G.H., Jereb J., LoBue P.A., Iademarco M.F., Metchock B., Vernon A. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold Test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR Recomm. Rep.* 2005; 54: 49–55, <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5415a4.htm>.
19. Mazurek M., Jereb J., Vernon A., LoBue P., Goldberg S., Castro K. IGRA Expert Committee; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection — United States, 2010. *MMWR Recomm. Rep.* 2010; 25: 59: 1–25.
20. Streeton J.A., Desem N., Jones S. L. Sensitivity and specificity of a gamma interferon blood test for tuberculosis infection. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 1998; 2: 443–450.
21. Brock I., Munk M.E., Kok-Jensen A., Andersen P. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2001; 5: 462–467.
22. Arend S.M., Andersen P., Meijgaarden K.E. i wsp. Detection of active tuberculosis infection by T-cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. *J. Infect. Dis.* 2000; 181: 1850–1854.
23. Arend S.M., Geluk A., van Meijgaarden K.E. i wsp. Antigenic equivalence of human T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. *Infect. Immun.* 2000; 68: 3314–3321.
24. Arend S.M., Engelhard A.C.F., Groot G. i wsp. Tuberculin skin testing compared with T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8: 1089–1096.
25. Delgado J.C., Tsai E.Y., Thi S. i wsp. Antigen-specific and persistent tuberculin anergy in a cohort of pulmonary tuberculosis patients from rural Cambodia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99: 7576–7581.
26. 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.
27. Harboe M., Oettinger T., Wiker H.G., Rosenkrands I., Andersen P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 1996; 64: 16–22.
28. Lalvani A., Nagvenkar P., Udawadia Z. i wsp. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. *J. Infect. Dis.* 2001; 183: 469–477.
29. Mustafa A.S., Oftung F., Amoudy H. A. i wsp. Multiple epitopes from the *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen are recognized by antigen-specific human T-cell lines. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 30 (supl. 3): S201–S205.
30. Ravn P., Demissie A., Eguale T. i wsp. Human T-cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 1999; 179: 637–645.
31. Borkowska D., Zwolska Z., Michałowska-Mitczuk D. i wsp. Interferonowy test T-SPOT.TB w diagnostyce latentnego zakażenia prątkiem gruźlicy. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2011; 79: 264–271.