

Dagmara Borkowska¹, Zofia Zwolska¹, Dorota Michałowska-Mitczuk², Maria Korzeniewska-Koseła³, Anna Zabost¹, Agnieszka Napiórkowska¹, Monika Kozińska¹, Sylwia Brzezińska¹, Ewa Augustynowicz-Kopec¹

¹Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Z. Zwolska

²Przychodnia Przykliniczna, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Kierownik: dr n. med. D. Michałowska-Mitczuk

³Zakład Epidemiologii i Organizacji Walki z Gruźlicą, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. M. Korzeniewska-Koseła

Interferonowy test T-SPOT.TB w diagnostyce latentnego zakażenia prątkiem gruźlicy

Interferon-gamma assays T-SPOT.TB for the diagnosis of latent tuberculosis infection

Abstract

Introduction: The diagnosis of latent tuberculosis infection (LTBI) is currently based on the century-old tuberculin skin test (TST). However a positive reaction can result from infection by *Mycobacterium tuberculosis*, BCG vaccination or cross-reaction with nontuberculous mycobacteria. T-SPOT.TB assay is a new test to diagnose tuberculosis infection by measuring in vitro T-cell interferon gamma release in response to two *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens: ESAT-6 and CFP 10.

Material and methods: T-SPOT.TB assay has been performed on whole blood samples ($n = 137$) from March to September 2010. A tuberculin skin test result was available for 96 of participants. A positive TST result was considered if the induration was 10 mm or more.

Results: Of the 137 patients tested, T-SPOT.TB assay results were positive in 37 (27%), negative in 98 (71.5%) and indeterminate in only 2 (1.5%) persons. We analyzed T-SPOT.TB and TST results in the 96 patients for whom both test were available. Concordance between T-SPOT.TB and TST results (10 mm skin reaction interpreted as positive) was 79%. Fifteen (15.6%) patients had a positive TST result and a negative T-SPOT.TB and 5 (5.2%) patients had a negative TST result and a positive T-SPOT.TB. We observed good correlation between positive T-SPOT.TB results and the size of induration ≥ 15 mm in TST results.

Conclusions: T-SPOT.TB offers a more accurate approach than TST for identification tuberculosis infection. The study shows that the test T-SPOT.TB is a good diagnostic tool in identifying persons with tuberculosis infection. For full confirmation of this assessment, it is necessary to examine more cases.

Key words: latent tuberculosis infection, IGRA tests, tuberculin skin test, interferon γ , antigens ESAT-6 and CFP 10

Pneumonol. Alergol. Pol. 2011; 79, 4: 264–271

Streszczenie

Wstęp: Diagnostyka latentnego zakażenia prątkiem gruźlicy (LTBI) opierała się dotychczas na ponad stuletniej próbie tuberkulinowej (TST). Dodatni wynik odczynu skórnoego świadczy nie tylko o zakażeniu *Mycobacterium tuberculosis*, ale może być również skutkiem szczepienia BCG lub wynikiem krzyżowej reakcji z prątkami niegruźliczymi. W ostatnim okresie pojawiły się dwa testy umożliwiające rozpoznanie utajonego zakażenia prątkiem gruźlicy IGRA. Jednym z nich jest przedstawiony w niniejszej pracy test T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Abingdon, UK). Polega on na zliczaniu *in vitro* limfocytów T wydzielających interferon gamma (IFN- γ) po stymulacji dwoma antygenami swoistymi dla *M. tuberculosis*: ESAT-6 i CFP 10.

Adres do korespondencji: prof. nadzw. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopec, Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa, tel./faks: 22 43 12 182; e-mail: e.kopec@igichp.edu.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 18.11.2010 r.

Copyright © 2011 Via Medica

ISSN 0867-7077

Materiał i metody: W okresie od marca do września 2010 roku za pomocą testu T-SPOT.TB przebadano 137 osób. Skórny odczyn tuberkulinowy wykonano u 96 z nich. Za wynik dodatni przyjęto wartość 10 mm.

Wyniki: Wśród 137 osób, u których wykonano test T-SPOT.TB, wyniki pozytywne uzyskano u 37 osób (27%), negatywne u 98 (71,5%), a u 2 osób wynik testu był nieokreślony (1,5%). Dalszej analizie poddano 96 ze 137 osób, które jednocześnie miały wykonany TST. Ogólna zgodność obu testów wynosiła 79%. Niezgodność testów TST (dodatni)/T.SPOT.TB (ujemny) występowała w 15 przypadkach (15,6%), a niezgodności TST (ujemny)/T-SPOT.TB (dodatni) u 5 osób (5,2%). Stwierdzono dodatnią korelację między liczbą pozytywnych wyników testów T-SPOT.TB i co najmniej 15-milimetrową średnicą nacieku TST.

Wnioski: Z przeprowadzonych u 137 osób badań wynika, że test T-SPOT.TB jest dobrym narzędziem diagnostycznym w identyfikacji osób z zakażeniem prątkiem gruźlicy. Dla pełnego potwierdzenia tej oceny konieczne jest przeanalizowanie większej liczby przypadków.

Słowa kluczowe: utajone zakażenie prątkiem gruźlicy, testy IGRA, test tuberkulinowy, interferon g, antygeny ESAT-6 i CFP 10
Pneumonol. Alergol. Pol. 2011; 79, 4: 264–271

Wstęp

Stosowanie tuberkuliny ma swoją ponad stuletnią historię i zostało zapoczątkowane w czasach, kiedy odkrywca prątków gruźlicy, laureat nagrody Nobla, profesor Robert Koch prowadził badania nad poszukiwaniem leku na gruźlicę. Ponieważ w 2010 rok obchodzono 100-lecie śmierci Roberta Kocha, warto poświęcić kilka słów odkryciu tuberkuliny.

Koch zajął się poszukiwaniem leku na gruźlicę, kiedy był już znanym w świecie lekarzem bakteriologiem i odkrywcą *Vibrio cholerae*, cyklu życiowego *Bacillus anthracis* i *Mycobacterium tuberculosis*. Był autorytetem w dziedzinie medycyny i posiadał wielkie uznanie władz niemieckich. Do pełnego sukcesu w walce z „białą plagą” — gruźlicą potrzebny był lek, który miał zapewnić ocalenie ludzkości. Robert Koch na bulionie z gliceryną przygotował płynną hodowlę prątków i poddał ją działaniu wysokiej temperatury. Substancja ta podawana świnkom morskim powodowała cofanie się zmian gruźliczych. Wydawało się, że wyciąg jest lekiem przeciwgruźliczym. Na wiadomość o pomyślnych wynikach wstępnych badań z tuberkuliną władze niemieckie „wywarły wpływ” na Kocha, aby wystąpił z odkryciem publicznie. W 1890 roku zaprezentował wyniki swoich pierwszych badań klinicznych na ludziach. Powszechnie sądzono, że badania zostały sprawdzone i miały dobrą dokumentację kliniczną. Jednak raporty lekarzy i anatomopatologów szybko zdyskwalifikowały tuberkulinę jako lek [1–4]. „Limfa Kocha”, której ostateczną nazwę „tuberkulina” zaproponował polski lekarz i mikrobiolog Odo Feliks Bujwid, znalazła późniejsze zastosowanie jako test diagnostyczny [1]. W 1906 roku Clemens Peter Freiherr von Pirquet jako pierwszy opisał przydatność tuberkuliny jako testu diagnostycznego do stwierdzenia istniejącego lub przebytego zakażenia *M. tuberculosis*. Wykazał, że podskórne podanie tuberku-

liny wywołuje silną reakcję u osób, które wcześniej miały kontakt z prątkami. Charles Mantoux w 1907 roku zmodyfikował sposób podawania tuberkuliny na śródskórny, który jest stosowany do dzisiaj [1, 4].

W Polsce od 1966 roku stosuje się odmianę tuberkuliny PPD (*purified protein derivative*) — tuberkulinę RT 23 (*renset tuberculin*, 23. seria), produkowaną w Instytucie Surowic i Szczepionek w Kopenhadze. Wprowadza się ją śródskórnie w dłoniową powierzchnię przedramienia w ilości dwóch jednostek [5, 6]. Wynik odczytuje się po upływie 48–72 godzin, mierząc średnicę utworzonego nacieku poprzecznie do długiej osi przedramienia [6]. Tuberkulina indukuje rozwój nadwrażliwości typu późnego (DTH, *delayed type hypersensitivity*), w której uczestniczą limfocyty T i makrofagi zdolne do wytwarzania limfokin powodujących obrzęk, odkładanie fibryny i napływ innych komórek zapalnych. Nadwrażliwość typu późnego można wykryć w ciągu 2–4 tygodni od zakażenia [7, 8]. Tuberkulina jest mieszaniną ponad 200 białek, których determinanty antygenowe są wspólne dla większości prątków chorobotwórczych, mykobakterii z grupy MOTT (*mycobacteria other than tuberculosis*) i szczepu szczepionkowego BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*), co powoduje niską czułość testu skórniego. Wyniki dodatnie świadczą jedynie o wcześniejszym kontakcie z prątkami, nie rozstrzygając, czy jest to *M. tuberculosis* czy prątki atypowe [8–10]. W populacji szczepionej BCG u niektórych osób nawet po 15 latach od podania szczepionki odczyn skórny może być pozytywny [11]. Wyniki próby tuberkulinowej mogą być fałszywie ujemne w przypadku zbyt młodego lub podeszłego wieku pacjenta, chorób upośledzających funkcje układu odpornościowego, nowotworów, zakażenia HIV, a także leczenia immunosupresyjnego. Cięża i bardzo ciężkie postaci gruźlicy, na przykład ostra prosówka, mogą być również czynnikami powodującymi brak odpowiedzi na tuberkulinę [5, 8, 12, 13].

W Polsce, gdzie cała populacja jest szczepiona BCG, istotne jest stwierdzenie, czy dodatni wynik próby tuberkulinowej (TST, *tuberculin skin test*) jest związany z wcześniejszym szczepieniem czy z istniejącym zakażeniem *M. tuberculosis*.

W ostatnich latach pojawiły się nowe metody diagnozujące zakażenie prątkiem gruźlicy w stadium latencji jeszcze przed rozwojem choroby — immunologiczne testy IGRA (*interferon gamma release assays*) oceniające wytwarzanie interferonu gamma (IFN- γ , *interferon gamma*) przez limfocyty T [13, 14]. W odróżnieniu od TST w testach tych do stymulacji używa się specyficznych antygenów dla *M. tuberculosis*, które dzięki ogromnemu postępowi w genetyce prątka wyizolowano i otrzymano w formie rekombinowanej [8]. Należą do nich antygeny: wczesnowydzielniczego białka o masie cząsteczkowej 6 kDa (ESAT-6, *early secreted antigenic target 6 kDa*) i białka przesączu hodowlanego o masie cząsteczkowej 10 kDa (CFP-10, *culture filtrated protein 10 kDa*) [14]. Antygeny te są kodowane przez region RD-1 (*region of difference 1*) występujący w genomie *M. tuberculosis*, a nieobecny u *M. bovis* BCG, jak również u szczepów należących do MOTT z nielicznymi wyjątkami: *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. mageritense* [15–17]. Antygen ESAT-6 jest małym białkiem wydzielniczym zbudowanym z 95 aminokwasów. Zaobserwowano, że silnie aktywuje odpowiedź limfocytów T i jest wydzielany przez komórki prątka wraz z innym białkiem CFP-10 [17–19].

Obecnie na rynku są dostępne dwa testy immunologiczne IGRA do szybkiej diagnostyki zakażenia prątkiem gruźlicy: QuantiFERON-TbGold (Cellestis, Australia) i T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Wielka Brytania). Zasada działania tych testów opiera się na pomiarze IFN- γ , cytokiny wytwarzanej przez limfocyty T w odpowiedzi na antygeny ESAT-6 i CFP-10 metodą ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) lub identyfikacji limfocytów T wydzielających IFN- γ metodą ELISpot (*enzyme linked immuno-spot assay*) [15].

Testem nowej generacji jest T-SPOT.TB, zatwierdzony w 2005 roku przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*), w którym wykorzystuje się technikę ELISpot [15, 20]. Jest ona połączeniem techniki immunoenzymatycznej z krótkotrwałą hodowlą komórkową limfocytów T. Zaletą techniki ELISpot jest wysoka czułość metody, która polega na wykrywaniu pojedynczego limfocytu T pobudzonego przez antygeny *M. tuberculosis* [17].

Celem pracy była ocena przydatności nowego testu IGRA T-SPOT.TB do wykrywania latentnego zakażenia prątkiem gruźlicy u ludzi w grupach

zdrowych ochotników i pacjentów z podejrzeniem gruźlicy.

Materiał i metody

W okresie od marca do września 2010 roku przebadano za pomocą testu T-SPOT.TB 137 osób. Test IGRA wykonano zgodnie z protokołem producenta. W zależności od wieku osoby badanej do próbki heparynizowanej (heparyna litowa) pobierano odpowiednią ilość krwi obwodowej: 6 ml od dorosłych i dzieci powyżej 9. roku życia. Próbę tuberkulinową wykonano u 96 ze 137 osób przebadanych testem T-SPOT.TB. Następnie 96 osób, u których wykonano oba testy podzielono na 3 grupy według diagnozy lekarza klinicysty umieszczonej na skierowaniu: I grupa — 17 zdrowych ochotników, pracowników ochrony zdrowia w wieku 27–73 lat, II grupa — 49 chorych z podejrzeniem gruźlicy w wieku 13–67 lat oraz III grupa — 30 chorych z podejrzeniem innych chorób niż gruźlica w wieku 25–63 lat. Średnicę próby tuberkulinowej mierzono po upływie 48–72 godzin. Za wynik dodatni uznawano co najmniej 10-milimetryczny naciek.

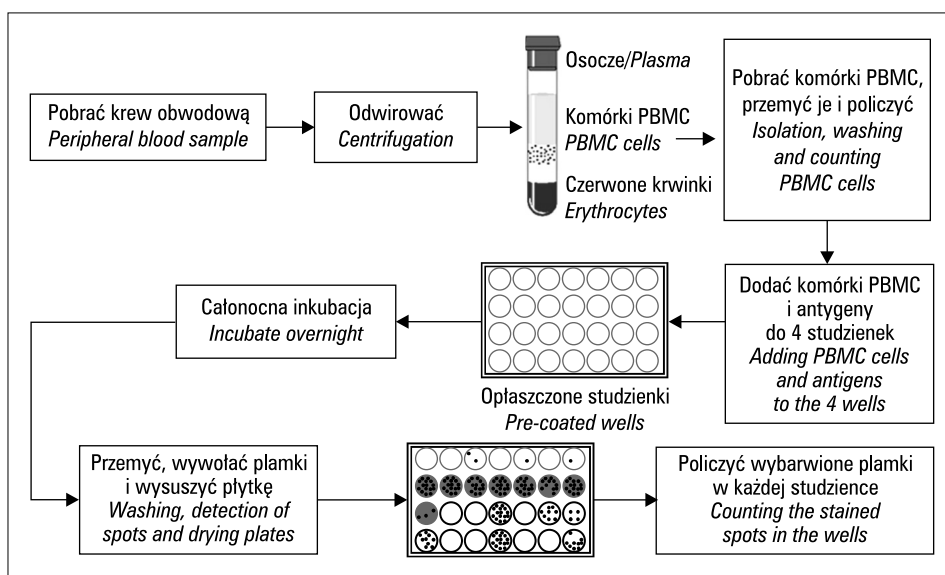
W teście T-SPOT.TB wyizolowane komórki jednojądrowe krwi obwodowej (PBMC, *peripheral blood mononuclear cell*) inkubuje się przez 16–20 godzin w obecności antygenów ESAT-6 i CFP-10. U osób zakażonych *M. tuberculosis* uczulone limfocyty T wydzielają IFN- γ , który łączy się ze specyficznymi dla siebie przeciwciałami pierwotnymi. Następnie dodaje się znakowane enzymem przeciwciała wtórne, które łączą się z innymi epitopami badanej cytokiny — IFN- γ . W wyniku reakcji kolorymetrycznej enzymu z substratem barwnym — chromogenem powstaje obraz ciemnoniebieskich, okrągłych plam, czyli *spots* [8, 12, 16, 20] (ryc. 1.).

Wynik testu T-SPOT.TB można uznać za pozytywny, jeśli liczba plamek (*spots*) chociaż w jednym z paneli A lub B wynosi co najmniej 6. Wynik można uznać za negatywny jeśli w obu panelach liczba plamek jest mniejsza niż 5 (ryc. 2).

Wyniki

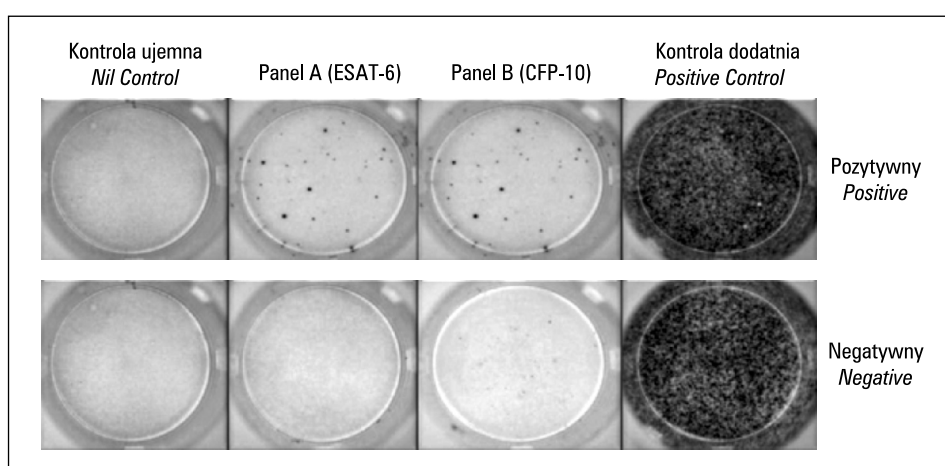
W grupie 137 osób, u których wykonano test T-SPOT.TB wyniki pozytywne uzyskano u 37 osób (27%), negatywne u 98 (71,5%), u 2 osób wynik testu był nieokreślony (1,5%) z powodu zbyt małej liczby limfocytów T (ryc. 3).

Dalszej analizie poddano 96 ze 137 osób, które równolegle miały wykonaną próbę tuberkulinową. U 44 osób (45,8%) uzyskano pozytywne wyniki TST, a u 52 osób (54,2%) negatywne. Wyniki zgodne dodatnie obu testów uzyskano u 29 osób (30,2%), nato-



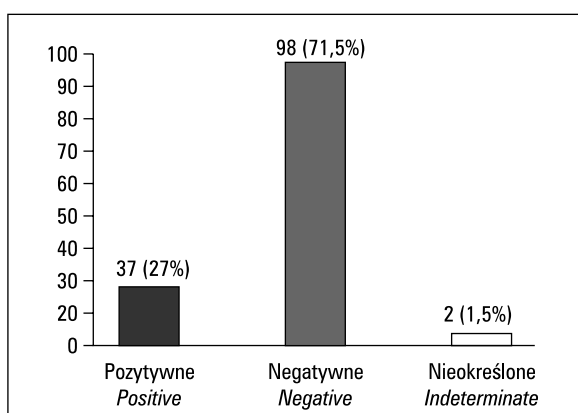
Rycina 1. Zasada testu T-SPOT.TB

Figure 1. The main steps of the T-SPOT.TB assay



Rycina 2. Interpretacja wyników testu T-SPOT.TB

Figure 2. T-SPOT.TB assay results interpretation

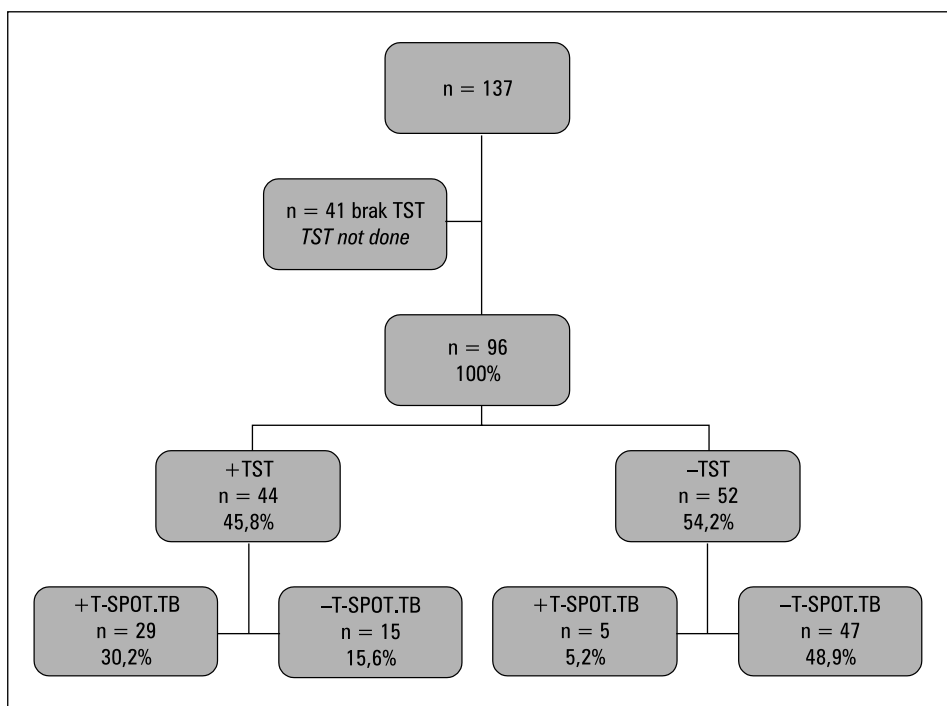


Rycina 3. Wyniki testu T-SPOT.TB w badanej grupie (n = 137)

Figure 3. T-SPOT.TB results for tested group (n = 137)

miast niezgodność testów TST (dodatni)/T.SPOT.TB (ujemny) występowała w 15 przypadkach (15,6%). Drugi rodzaj niezgodności TST (ujemny)/T.SPOT.TB (dodatni) występował u 5 badanych (5,2%), zaś wyniki zgodne ujemne — u 47 osób (48,9%). Wyniki zgodne obu testów uzyskano u 76/96 osób. Zgodność testów T-SPOT.TB i TST wynosiła 79% (ryc. 4).

Grupę 96 osób u których wykonano T-SPOT.TB i próbę tuberkulinową TST podzielono na 3 podgrupy badawcze: zdrowi ochotnicy (pracownicy ochrony zdrowia), chorzy z podejrzeniem gruźlicy i chorzy z podejrzeniem chorób innych niż gruźlica. Wśród 17 badanych ochotników 7 (41,2%) z pozytywnym wynikiem testu T-SPOT.TB miało również dodatni TST. U 4 osób (23,5%)



Rycina 4. Rozkład wyników testu T-SPOT.TB przy dodatnich i ujemnych wynikach TST (n = 96)

Figure 4. Distribution of T-SPOT.TB results in TST-positive and TST-negative patients (n = 96)

Tabela 1. Porównanie wyników testów T-SPOT.TB i TST w grupie pracowników ochrony zdrowia (n = 17)

Table 1. Comparison between the results of the T-SPOT.TB assay and TST in health care workers group (n = 17)

T-SPOT.TB	Pozytywny/Positive		TST Negatywny/Negative		Razem/Total	
	n	%	n	%	n	%
Pozytywny/Positive	7	41,2	0	0	7	41,2
Negatywny/Negative	4	23,5	6	35,3	10	58,8
Razem/Total	11	64,7	6	35,3	17	100

z ujemnym wynikiem T-SPOT.TB stwierdzono dodatni TST. U 6 osób (35,3%) wyniki obu testów były ujemne. Zgodność testów w grupie zdrowych ochotników wynosiła 76,5% (tab. 1).

W grupie 49 chorych z podejrzeniem gruźlicy u 26 pacjentów (53,1%) stwierdzono pozytywne wyniki testu T-SPOT.TB, wśród nich 4 osoby (8,2%) miały ujemne wyniki TST. W grupie 23 osób (46,9%) z ujemnymi wynikami testu T-SPOT.TB, dodatni wynik TST stwierdzono u 8 (16,3%) chorych. Wyniki dodatnie w obu testach stwierdzono u 22 chorych z podejrzeniem gruźlicy (44,9%), ujemnie u 15 (30,6%). Zgodność testów T-SPOT.TB i TST wynosiła 75,5% (tab. 2).

W grupie 30 osób z podejrzeniem chorób innych niż gruźlica żaden z badanych nie miał dodatnich wyników obu testów. Tylko u 1 osoby (3,3%) stwier-

dzono pozytywny wynik testu T-SPOT.TB przy ujemnym wyniku TST. Pozostali chorzy mieli ujemne wyniki testu IGRA, a tylko 3 z nich dodatnie tuberkulinowe wyniki TST. Zgodność wyników testów w tej grupie wynosiła 86,7% (tab. 3.)

W grupie 96 osób, u których wykonano testy IGRA i TST zaobserwowano, że pozytywne wyniki testów T-SPOT.TB korelują z wielkością średnicy odczynu tuberkulinowego. Wyniki testu T-SPOT.TB przyporządkowano do 3 grup w zależności od średnicy nacieku: poniżej 10 mm, 10–15 mm, co najmniej 15 mm. Wśród odczynów o średnicy poniżej 10 mm było 6 (6,2%) pozytywnych wyników testu IGRA. W grupie odczynów o średnicy 10–15 mm dodatnich wyników testu IGRA było 8 (8,3%). Najwięcej 21 (21,9%) pozytywnych wyników T-SPOT.TB pojawiło się przy odczynie co naj-

Tabela 2. Porównanie wyników testów T-SPOT.TB i TST w grupie chorych z podejrzeniem gruźlicy (n = 49)

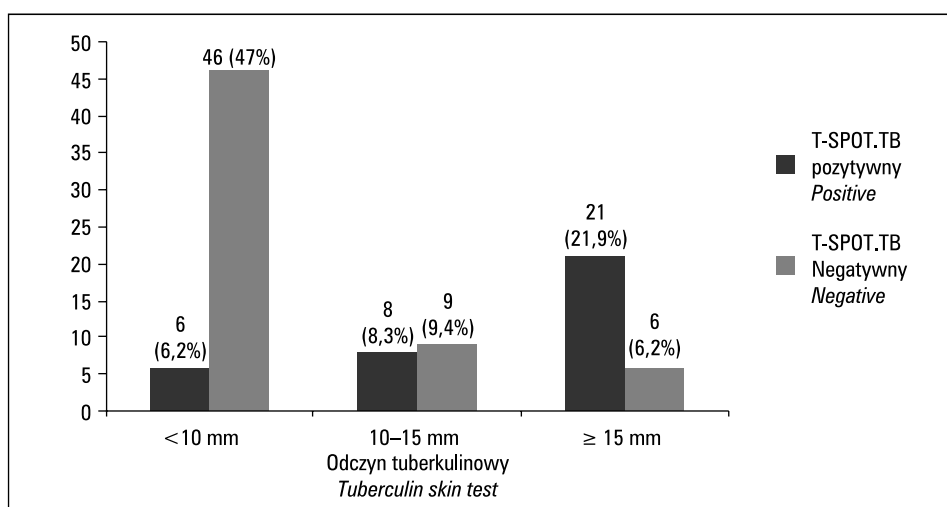
Table 2. Comparison between the results of the T-SPOT.TB assay and TST in patients with clinical suspicion of tuberculosis (n = 49)

T-SPOT.TB	Pozytywny/Positive		TST Negatywny/Negative		Razem/Total	
	n	%	n	%	n	%
Pozytywny/Positive	22	44,9	4	8,2	26	53,1
Negatywny/Negative	8	16,3	15	30,6	23	46,9
Razem/Total	30	61,2	19	38,8	49	100

Tabela 3. Porównanie wyników testów T-SPOT.TB i TST w grupie osób z chorobami innymi niż gruźlica (n = 30)

Table 3. Comparison between the results of the T-SPOT.TB assay and TST in patients with diseases other than tuberculosis (n = 30)

T-SPOT.TB	Pozytywny/Positive		TST Negatywny/Negative		Razem/Total	
	n	%	n	%	n	%
Pozytywny/Positive	0	0	1	3,3	1	3,3
Negatywny/Negative	3	10	26	86,7	29	96,7
Razem/Total	3	10	27	90	30	100



Rycina 5. Rozkład wyników testu T-SPOT.TB w zależności od średnicy odczynu tuberkulinowego (n = 96)

Figure 5. Distribution of T-SPOT.TB results and tuberculin skin test results-stratified according to the size of induration (n = 96)

mniej 15 mm. Stwierdzono dodatnią korelację między liczbą pozytywnych wyników testów T-SPOT.TB i średnicą nacieku odczynu tuberkulinowego co najmniej 15 mm (ryc. 5).

Dyskusja

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) szacuje, że jedna trzecia po-

pulacji świata jest zakażona prątkiem gruźlicy. Wśród osób z utajoną infekcją gruźliczą (LTBI, *latent tuberculosis infection*) u około 10% dochodzi do przejścia zakażenia w aktywną formę choroby [16, 20]. Ryzyko zachorowania wzrasta u osób, które zostały niedawno zakażone lub mają osłabiony układ odpornościowy [9, 21].

Do tej pory zakażenie prątkiem gruźlicy było diagnozowane za pomocą odczynu tuberkulinowe-

go, który charakteryzuje się dość niską swoistością [18]. Trudności powodowało również prawidłowe wykonanie i interpretacja TST oraz konieczność dwukrotnej wizyty pacjenta w placówce ochrony zdrowia [9, 22, 23]. W Polsce, gdzie populacja jest poddawana szczepieniu BCG, dodatnie wyniki TST mogą być związane z wakcynacją. W teście T-SPOT.TB użyty kompleks wyselekcjonowanych antygenów *M. tuberculosis* zwiększa swoistość badania przez redukcję reakcji krzyżowej ze szczepionką BCG oraz większością prątków środowiskowych [7, 9, 10]. Test ten zawiera dwa oddzielne panele A i B, do których są dodawane antygeny ESAT-6 i CFP-10, co gwarantuje optymalną czułość testu i możliwość wykrycia zakażenia prątkiem gruźlicy wśród osób z ujemnym wynikiem próby tuberkulinowej. Ze względu na brak „złotego standardu” w diagnozowaniu LTBI [24] nie ma możliwości określenia czułości i swoistości testów T-SPOT.TB i TST. Zależność ta nie została określona w żadnej pracy opisującej korelację obu testów. W związku z tym w niniejszej pracy analizie poddano zgodność między wynikami obu testów, która mogła posłużyć jako metoda zastępcza do oszacowania prawdopodobieństwa zakażenia prątkiem gruźlicy. Wyniki licznych badań potwierdzają, że zgodność wyników między testami IGRA a próbą tuberkulinową wynosi 60–80% [16].

Brodie i wsp. podają, że wśród imigrantów szczepionych BCG ogólna zgodność wyników testów T-SPOT.TB i TST wynosiła 64%, a w grupie nieszczepionej 82% [25]. Mazurek i wsp. donoszą, że wyniki testu QuantiFERON-TB — drugiego z testów IGRA i TST są zgodne w 83%. Badanie przeprowadzono wśród 1226 dorosłych o różnym stopniu ryzyka zakażenia prątkiem gruźlicy. Niezgodność typu IGRA (ujemny)/TST (dodatni) była 7 razy częstsza u osób szczepionych BCG niż u nieszczepionych [26].

Fietta i wsp. stwierdzili zgodność wyników omawianych testów na poziomie 78% wśród 258 pacjentów z różnym stopniem ryzyka zakażenia *M. tuberculosis*. Test IGRA wykrył zakażenie u 91% badanych, a TST tylko u 65%. Większość pacjentów z pozytywnym wynikiem IGRA i negatywnym TST miało co najmniej jeden czynnik zwiększający ryzyko gruźlicy, ale również ryzyko fałszywie ujemnego wyniku próby tuberkulinowej: podeszły wiek, zapalenie wątroby typu C, alkoholizm, rak, terapia steroidami lub niewydolność nerek [27].

W badaniach własnych wśród 96 osób, u których wykonano T-SPOT.TB i TST ogólna zgodność testów wynosiła 79%. Ewer i wsp. badali utajone zakażenie prątkiem gruźlicy wśród uczniów jednej z brytyjskich szkół. Zastosowali T-SPOT.TB i test HEAF (odpowiednik TST stosowany u dzie-

ci w Wielkiej Brytanii). Ogólna zgodność testów wynosiła 89%. Stwierdzono, że na wyniki testu T-SPOT.TB nie miała wpływu szczepionka BCG. Natomiast średnice odczynów testu HEAF u dzieci szczepionych BCG były znacznie większe niż u nieszczepionych. Pozytywne wyniki testu IGRA przy ujemnym TST wskazywały na większe prawdopodobieństwo zakażenia prątkiem gruźlicy niż pozytywne wyniki TST przy ujemnym IGRA [10].

W badaniach własnych stwierdzono oba rodzaje niezgodności testów: TST (dodatni)/T-SPOT.TB (ujemny) w 15 przypadkach (15,6%) i /mógły być związane ze szczepieniem BCG. Niezgodności TST (ujemny)/T-SPOT.TB (dodatni) stwierdzono u 5 osób (5,2%), gdzie przyczyną mógł być brak reakcji skórnej na tuberkulinę wynikający z wieku pacjentów lub złego stanu zdrowia. U Nienhausa i wsp. układ wyników niezgodnych był podobny. Niezgodność typu TST (dodatni)/T-SPOT.TB (ujemny) stwierdzono wśród 12,1% badanych, a niezgodność TST (ujemny)/T-SPOT.TB (dodatni) tylko u 3,1% [28].

W przeprowadzonej analizie w każdej z trzech grup (zdrowi ochotnicy — pracownicy ochrony zdrowia, chorzy z podejrzeniem gruźlicy i chorzy z podejrzeniem innych chorób niż gruźlica) zaobserwowano większy odsetek osób z dodatnim wynikiem TST od odsetka osób z dodatnim wynikiem testu T-SPOT.TB.

Ferrara i wsp. stwierdzili, że wśród 255 pacjentów, u których wykonano test QuantiFERON-TB Gold i TST, liczba pozytywnych wyników testów IGRA wzrastała wraz ze zwiększającą się wartością średnicy nacieku [9]. W badaniach własnych przeprowadzonych wśród 96 osób rezultaty były podobne. Najmniej — 6 (6,2%) pozytywnych wyników testu T-SPOT.TB uzyskano wśród osób z odczynem tuberkulinowym o średnicy poniżej 10 mm, natomiast najwięcej — 21 (21,9%) przy odczynie co najmniej 15 mm.

Testy IGRA nie wykazują fałszywie dodatnich wyników u osób szczepionych BCG. Można je często powtarzać, ponieważ nie ma efektu wzmocnienia (*boosting*), który występuje przy powtarzaniu próby tuberkulinowej, co w konsekwencji wywołuje wyniki fałszywie dodatnie [14]. W skład tuberkuliny wchodzi między innymi antygeny ESAT-6 i CFP-10 wykorzystane w teście T-SPOT.TB, w związku z tym wykonanie próby tuberkulinowej przed pobraniem krwi do testu IGRA może być przyczyną niewiarygodnych wyników testów interferonowych. Potwierdzają to rezultaty ostatnio przeprowadzonych badań, które wykazały, że w czasie około 6 miesięcy od założenia próby tuberkulinowej trwa produkcja interferonu γ przez uczulone limfocyty T [13, 30].

Zaletą testu T-SPOT.TB jest krótki czas uzyskania wyniku (1–2 doby) oraz brak konieczności powtórnej wizyty pacjenta w placówce zdrowia. Do wykonania testu wymaga się jednorazowego pobrania krwi od pacjenta. Interpretacja testu jest prosta, a uzyskanie wyników trudnych do interpretacji, czyli tak zwanych wyników nieokreślonych, niezmiernie rzadkie. W badaniach własnych wyniki te stanowiły tylko 1,5%, czyli dwa przypadki na 137 wykonanych testów. T-SPOT.TB może być pomocny w rozpoznaniu zakażenia gruźliczego w grupach ryzyka wśród pracowników laboratoriów, więźniów, bezdomnych, osób pozostających w bliskim kontakcie z chorymi na gruźlicę — szczególnie dzieci oraz pacjentów zakwalifikowanych do leczenia biologicznego [8, 9, 13, 29, 30]. Zakażenie latentne, choć ma bezobjawowy przebieg i nie stanowi bezpośredniego zagrożenia epidemiologicznego, to dla osób z przewlekłymi chorobami zapalnymi jest przeszkodą w zakwalifikowaniu do leczenia biologicznego. Chorzy na łuszczycę, reumatoidalne zapalenie stawów, chorobę Leśniewskiego i Crohna leczeni antagonistami TNF (*tumor necrosis factor*) mają większe prawdopodobieństwo zachorowania na gruźlicę. Dlatego u tych pacjentów konieczne jest wykonanie zarówno TST, jak i testu IGRA w celu identyfikacji LTBI i podanie ich profilaktycznemu leczeniu gruźlicy [30].

Wnioski

1. Z przeprowadzonych badań wynika, że test T-SPOT.TB jest dobrym narzędziem diagnostycznym w identyfikacji osób zakażonych prątkiem gruźlicy. Dla pełnego potwierdzenia tej oceny konieczne jest przeprowadzenie testu na większej liczbie osób.
2. Porównując dwa testy — odczyn tuberkulinowy i T-SPOT.TB stwierdzono najwięcej zgodnych wyników przy odczynie co najmniej 15 mm.
3. W przeprowadzonych badaniach zgodność obu testów wynosiła średnio 79%.

Piśmiennictwo

1. Zwolska Z. Robert Koch — twórca bakteriologii chorób zakaźnych. Via Medica, Gdańsk 2006.
2. Augustynowicz-Kopeć E., Zwolska Z. Postępy w diagnostyce i epidemiologii molekularnej *Mycobacterium tuberculosis*. Konferencja Naukowa „Mikrobiologia 100 lat po Robercie Kochu” PTM, Warszawa 2010.
3. Zwolska Z. Koch i jego dokonania — rys historyczny. Konferencja Naukowa „Mikrobiologia 100 lat po Robercie Kochu” PTM, Warszawa 2010.
4. Gradmann C. Robert Koch and the white death: from tuberculosis to tuberculin. *Microbes Infect.* 2006; 8: 294–301.
5. Kruczak K., Skucha W., Duplaga M., Sanak M., Niżankowska-Mogilnicka E. Assessment of the latent tuberculosis infection (LTBI) with QuantiFERON-GIT (QFT-GIT) assay in selected risk groups in Krakow. *Borgis — Nowa Medycyna* 2009; 1: 37–42.
6. Kang Y. A., Lee H. W., Yoon H. I. i wsp. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon γ assay for

- the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA* 2005; 293: 2756–2785.
7. Kruczak K., Niżankowska-Mogilnicka E. The new diagnostics methods of latent tuberculosis infection. *Pneumol. Alergol. Pol.* 2008; 76: 446–450.
8. Lalvani A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century. New tools to tackle an old enemy. *Chest* 2007; 131: 1898–1906.
9. Ferrara G., Losi M., Meacci M. i wsp. Routine hospital use of a new commercial whole blood interferon- γ assay for the diagnosis of tuberculosis infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005; 172: 631–635.
10. Ewer K., Deeks J., Alvarez L. i wsp. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *The Lancet* 2003; 361: 1168–1173.
11. Paluch-Oleś J., Kozioł-Montewka M. Evaluation of usefulness of QuantiFERON-TB Gold in tube assay and tuberculin skin test for immunodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Borgis — Nowa Medycyna* 2009; 1: 32–36.
12. Ferrara G., Losi M., D'Amico R. i wsp. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *The Lancet* 2006; 367: 1328–1334.
13. Demkow U. Commentary to the article of K. Kruczak and E. Niżankowska-Mogilnicka: "The new diagnostic methods of latent tuberculosis infection". *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2008; 76: 468–471.
14. Ziolkowski J. Gruźlica dziecięca. *Borgis, Warszawa* 2010.
15. Van Leeuwen R.M.L., Bossinka W.J., Thijsen S.F.T. Exclusion of active *Mycobacterium tuberculosis* complex infection with the T-SPOT.TB assay. *Eur. Respir. J.* 2007; 29: 605–607.
16. Pai M., Riley L. W., Colford Jr J.M. Interferon- γ assay in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 2004; 4: 761–776.
17. Lalvani A. Counting antigen-specific T cells: a new approach for monitoring response to tuberculosis treatment? *CID* 2004; 38: 757–759.
18. van Pinxteren L.A.H., Ravn P., Agger E.M., Pollock J., Andersen P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP 10. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000; 2: 155–160.
19. Harboe M., Oettinger T., Wiker H. G. i wsp. 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.
20. Pai M., Kalantri S., Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part I. Latent tuberculosis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006; 3: 413–422.
21. Stefan D.C., Dippenaar A., Detjen A.K. i wsp. Interferon-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children with cancer. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2010; 6: 689–694.
22. Demkow U., Filewska M., Białaś B. i wsp. Antimycobacterial antibody level in pleural, pericardial and cerebrospinal fluid of patients with tuberculosis. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2004; 72: 105–109.
23. Leung C.C., Yam W.C., Yew W.W. i wsp. T-Spot.TB outperforms tuberculin skin test in predicting tuberculosis disease. *AJRCCM* 2010; 182: 834–840.
24. Shams H., Weis S.E., Klucar P. i wsp. Enzyme-linked immunospot and tuberculin skin testing to detect latent tuberculosis infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005; 1161–1168.
25. Brodie D., Lederer D.J., Gallardo J.S., Trivedi S.H., Burzynski J.N., Schluger N.W. Use of an interferon- γ release assay to diagnose latent tuberculosis infection in foreign-born patients. *Chest* 2008; 4: 869–874.
26. 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.
27. Fietta A., Meloni F., Cascina A. i wsp. Comparison of a whole-blood interferon-gamma assay and tuberculin skin testing in patients with active tuberculosis and individuals at high or low risk of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am. J. Infect. Control.* 2003; 31: 347–353.
28. 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; 7: e2665.
29. Lalvani A. Counting antigen-specific T cells: a new approach for monitoring response to tuberculosis treatment? *CID* 2004; 38: 757–758.
30. Korzeniewska-Koseła M. Prevention of tuberculosis in patients treated with tumour necrosis factor antagonists. *Reumatologia* 2010; 48: 4–13.