

ROK 2004 • TOM 72 • SUPLEMENT 4

PNEUMONOLOGIA I ALERGOLOGIA POLSKA

Dawniej
PNEUMONOLOGIA POLSKA
istnieje od 1926 r.

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA FTYZJOPNEUMONOLOGICZNEGO
POLSKIEGO TOWARZYSTWA ALERGOLOGICZNEGO
I INSTYTUTU GRUŻLICY I CHORÓB PŁUC

Rada Redakcyjna:

Wojciech Biernacki – Londyn,
Ryszarda Chazan – Warszawa,
Elżbieta Chyczewska – Białystok,
Paweł Górski – Łódź,
Iwona Grzelewska-Rzymowska – Łódź,
Marek Jakóbiśiak – Warszawa,
Renata Jankowska – Wrocław,
Jacek Jassem – Gdańsk,
Jerzy Kozielski – Zabrze,
Piotr Kuna – Łódź,
Ryszard Kurzawa – Rabka,
Jan Kuś – Warszawa,
Henryk Mazurek – Rabka,
Janusz Milanowski – Lublin,
Józef Małolepszy – Wrocław,

Ewa Niżankowska-Mogilnicka – Kraków,
Tadeusz Orłowski – Warszawa,
Władysław Pierzchała – Katowice,
Tadeusz Plusa – Warszawa,
Kazimierz Roszkowski – Warszawa,
Ewa Rowińska-Zakrzewska – Warszawa,
Janina Słodkowska – Warszawa,
Marek Słomiński – Gdańsk,
Paweł Śliwiński – Warszawa,
Witold Tomkowski – Warszawa,
Adam Torbicki – Warszawa,
Michał Unger – Filadelfia,
Jadwiga Wędzicha – Londyn,
Jan Zieliński – Warszawa,
Zofia Zwolska – Warszawa.

Redaktor naczelna:
doc. dr hab. med. Elżbieta Wiatr

Redaktorzy
prof. dr hab. med. Dorota Górecka

dr med. Urszula Demkow

Sekretarz Redakcji:
Mirosława Kostek

Rozprawa habilitacyjna

**ODPOWIEDŹ HUMORALNA NA ANTYGENY PRĄTKA
W RÓŻNYCH POSTACIACH GRUŹLICY I JEJ WARTOŚĆ
DIAGNOSTYCZNA**

Urszula Anna Demkow

Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc

Pneumonol. Alergol. Pol. 2004, 72

Redakcja

Adres Redakcji: 01-138 Warszawa, ul. Płocka 26,
tel. (022) 43-12-108, fax. (022) 43-12408, e-mail: 3klinika@igichp.edu.pl

Spis treści

1.	Wstęp.....	4
2.	Cel pracy.....	8
3.	Materiał.....	8
4.	Metody.....	12
5.	Ocena statystyczna	13
6.	Wyniki	13
7.	Omówienie wyników.....	37
8.	Wnioski.....	55
9.	Piśmiennictwo	56

Wstęp

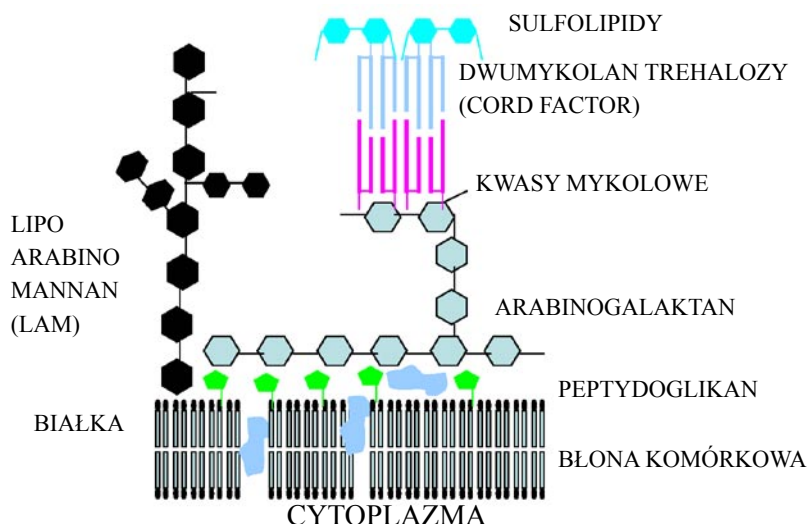
Gruźlica jest chorobą zakaźną znaną od czasów prehistorycznych. Ślady gruźlicy znajdowano w szczątkach ludzi pierwotnych, wspomniano o niej w papirusach egipskich, gruźlicę opisywał Hipokrates. Przez wiele wieków gruźlica pozostawała jedną z głównych przyczyn zgonów. Odkrycie prątków gruźlicy, wprowadzenie skutecznych leków przeciwprątkowych, a także zastosowanie nowoczesnych metod rozpoznawania gruźlicy, pozwalało mieć nadzieję na szybkie zwalczenie tej choroby. Jednakże pomimo ogromnego postępu w dziedzinie diagnostyki i leczenia, gruźlica nadal pozostaje ogromnym problemem zdrowotnym i społecznym.

Według danych Światowej Organizacji Zdrowia około 2 miliardy ludzi jest zakażonych prątkiem gruźlicy (1). Rocznie stwierdza się około 8 milionów nowych zachorowań (w tym 1,5 miliona dzieci) i około 3 milionów zgonów (500 000 dzieci) (1, 2, 3). Gruźlica jest najczęstszą przyczyną zgonów spośród wszystkich chorób zakaźnych (1). Obliczono, że na świecie, co 10 sekund umiera na gruźlicę 1 człowiek. Rozszerzanie się zakażenia wirusem HIV oraz czynniki społeczno-ekonomiczne (zubożenie społeczeństwa, bezdomność, niedożywienie, narkomania, ruchy migracyjne) prowadzą do wzrostu liczby zachorowań (4, 5).

Choć sytuacja epidemiologiczna w Polsce jest znacznie lepsza niż w biednych krajach Afryki czy Azji, to jednak od wielu lat posiadamy jedno z najgorszych wskaźników epidemiologicznych w Europie (2, 3, 6). Wynika to w dużej mierze ze złej sytuacji epidemiologicznej, jaka panowała w naszym kraju zaraz po II wojnie światowej, kiedy to rocznie odnotowano ponad 200.000 zachorowań i blisko 11% wszystkich zgonów było spowodowanych gruźlicą

(3, 6). Ta dramatyczna sytuacja była przyczyną powstania przed 50 laty Instytutu Gruźlicy, który opracował i przyczynił się do wdrożenia w Polsce długofalowego programu zwalczania gruźlicy. Pozytywne trendy epidemiologiczne stwierdzano nieprzerwanie do 1989 roku, kiedy odnotowano zwolnienie tempa spadku liczby zachorowań (3). W 2002 roku zanotowano około 10.000 nowych zachorowań, czyli 27,6 przypadków na 100000 mieszkańców (6). Śmiertelność z powodu gruźlicy zmniejszyła się do 0,3% (6). Pomimo sukcesów w zwalczaniu gruźlicy, Polska ma dziś wskaźniki podobne do tych, jakie miały kraje Skandynawskie w 1950 roku, czyli przed wprowadzeniem leków przeciwprątkowych (4).

Dla opracowania nowych strategii zapobiegania i kontroli gruźlicy istotne jest wyjaśnienie mechanizmów zachodzących pomiędzy prątkiem a organizmem gospodarza (7). Stan układu odpornościowego jest najważniejszym czynnikiem decydującym o rozwoju gruźlicy u osoby zakażonej. U większości zdrowych osób odpowiedź immunologiczna jest bardzo skuteczna i 95% zakażonych nigdy nie zachoruje na gruźlicę (1, 8, 9). Wrażliwość na zachorowanie zależy od typu odpowiedzi immunologicznej na kluczowe dla rozwoju odporności antygeny prątka (10). Komórka *Mycobacterium tuberculosis* zawiera olbrzymią ilość antygenów związanych ze ścianą komórkową, z cytoplazmą, a także czynnie wydzielanych przez komórkę (11). Większość antygenów wchodzi w interakcje z organizmem gospodarza i odgrywa ważną rolę w patogenezie gruźlicy (7, 12, 13, 14, 15). Złożoną strukturę ściany komórkowej prątka przedstawia rycina 1.



Rycina 1. Budowa ściany komórkowej prątka

Kontakt z antygenami prątka uruchamia swoistą odpowiedź immunologiczną, zarówno humoralną jak i komórkową (8, 12, 16). Powszechnie uważa się, że w gruźlicy odporność bazuje przede wszystkim na mechanizmach komórkowych z udziałem swoiście pobudzonych limfocytów T i makrofagów (9, 12, 17, 18, 19). W odpowiedź immunologiczną przeciwko prątkom gruźlicy jest zaangażowanych szereg subpopulacji limfocytów (α/β CD4 i CD8, limfocyty γ/δ , limfocyty cytotoksyczne) (8, 9, 17, 18, 20), jednak kluczową rolę przypisuje się limfocytom CD4 (8, 17, 21). Przez ostatnie kilkanaście lat podkreślano ważną rolę polaryzacji odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th1 lub Th2 w patogenie gruźlicy (19, 21). Komórki Th1 produkują głównie interferon γ (INF γ) i interleukinę 2 (IL2) odpowiadające za aktywację makrofagów i odpowiedź typu komórkowego. Limfocyty Th2 uwalniają IL4, IL5 i IL10, cytokiny promujące odpowiedź humoralną (10, 17, 20, 22). Powszechnie przyjmowano, że cytokiny typu Th1 determinują odporność na zachorowanie na gruźlicę. Mediatorzy Th2 i związana z nimi odpowiedź humoralną wiąże się z progresją choroby (24). Teoria polaryzacji Th1/Th2 powstała jako wniosek z modeli eksperymentalnych na zwierzętach. Wydaje się jednak, że hipoteza całkowitej biegunowości odpowiedzi immunologicznej w gruźlicy nie w pełni tłumaczy patogenезę tej choroby (24, 25). Powszechnie wiadomo, że bardzo ciężkie, rozsiane postacie choroby jak gruźlica prosowata, czy postać rozsiana u chorych zakażonych wirusem HIV przebiegają z supresją zarówno odpowiedzi komórkowej jak i humoralnej (12, 26). Ponadto leczenie gruźlicy kluczową cytokiną Th1, interferonem γ (INF γ), jest nieskuteczne (26).

Mechanizmy odpowiedzi komórkowej w gruźlicy były intensywnie badane, niewiele jest jednak prac oceniających zależność pomiędzy nasileniem, rodzajem odpowiedzi humoralnej a postacią choroby i rozległością zmian chorobowych. Swoista aktywacja limfocytów B i produkcja przeciwciał towarzyszy odpowiedzi komórkowej, choć powszechnie przyjmuje się, że przeciwciała przeciwko antygenom prątka nie mają znaczenia obronnego (12, 27, 28, 29). Jednakże istnieją również hipotezy sugerujące wspomagający udział przeciwciał w odpowiedzi przeciwko prątkom gruźlicy (23, 30). Sugerowane mechanizmy ochronnej roli przeciwciał miałyby polegać na hamowaniu zjawiska adhezji prątków do tkanek gospodarza, promocji fuzji fagosom-lizosom, neutralizacji produktów metabolizmu prątków oraz wolnych rodników uszkadzających tkanki jak i modulacji odpowiedzi komórkowej (24, 30). Na modelu zwierzęcym wykazano, że myszy

pozbawione limfocytów B odpowiadają prawidłowo na zakażenie (29). W przypadku innego modelu mysiego wykazano znaczenie ochronne wyprodukowanych w przebiegu zakażenia przeciwciał monoklonalnych (24). Przeciwciała przeciwko antygenom prątka z pewnością nie odgrywają wiodącej roli w obronie przed zachorowaniem, być może jednak mogą one modyfikować odpowiedź organizmu na antygeny prątka (19, 23, 30, 31, 32, 33).

Niewiele jest prac oceniających nasilenie i typ odpowiedzi humoralnej w zależności od postaci choroby i rozległości zmian chorobowych. Istnieją doniesienia sugerujące, że bardziej nasilona odpowiedź humoralna koreluje częściej z martwiczym typem odpowiedzi na prątki gruźlicy oraz z większymi i bardziej masywnymi uszkodzeniami w obrębie zajętych narządów (21). Na mysim modelu gruźlicy wykazano, że pojawienie się IL4 w obrębie zmian chorobowych w płucach koreluje z nasileniem martwicy, pogorszeniem stanu klinicznego i wyższą śmiertelnością (21). Wykazano również, że wszystkie antygeny prątka wywołujące odpowiedź humoralną są silnymi stymulatorami odpowiedzi komórkowej (26, 34). Ciekawym zjawiskiem jest także zależność pomiędzy nasileniem martwicy tkanek a poziomem przeciwciał przeciwprątkowych. Zatem wiedza o odpowiedzi humoralnej w różnych stadiach zakażenia i choroby pozwoli lepiej naświetlić złożone zależności patogen – gospodarz w gruźlicy i być może, ułatwi identyfikację antygenów istotnych dla rozwoju odporności i/lub dla celów diagnostycznych (35).

Cechy swoistego pobudzenia układu odpornościowego, zarówno komórkowego jak i humoralnego, są wykorzystywane do rozpoznawania szeregu chorób zakaźnych (36). Test tuberkulinowy, chociaż mało czuły i swoisty, jest metodą wspomagającą rozpoznawanie gruźlicy i jej różnicowanie z innymi chorobami. W krajach gdzie nie stosuje się powszechnie szczepień BCG, jest on stosowany dla potwierdzenia zakażenia prątkiem gruźlicy.

Od kilkudziesięciu lat próbuje się wykorzystać ocenę poziomu przeciwciał przeciwprątkowych do celów diagnostycznych. Obecność przeciwciał przeciwprątkowych wykrywa się testami serologicznymi, wśród których najpowszechniejsze są metody immunoenzymatyczne (ELISA) (14, 36, 37, 38). Testy serologiczne mają dużą potencjalną wartość w diagnostyce gruźlicy ze względu na krótki czas i prostotę wykonania, niskie koszty oraz możliwość przeprowadzenia nawet w skromnie wyposażonym laboratorium (36). Jednak pomimo przeprowadzenia wielu badań, z za-

stosowaniem pojedynczych antygenów i zestawów antygenowych prątka, nadal brak jest jednoznacznego określenia miejsca i przydatności metod serologicznych w rozpoznawaniu gruźlicy. Konieczne jest precyzyjne określenie czy i w jakich postaciach gruźlicy metody serologiczne mogą być pomocne w diagnostyce. Przedmiotem intensywnych prac badawczych jest również poszukiwanie nowych antygenów prątka, zarówno białkowych jak i glikolipidowych, które pobudzają produkcję przeciwciał u osób chorych, nie wpływając na odpowiedź humoralną u osób zakażonych prątkiem, ani u osób zdrowych. Serodiagnostyka może również okazać się bardzo pomocna w wykrywaniu tych postaci gruźlicy, w których trudno uzyskać materiał do badań mikrobiologicznych lub ich czułość jest niska (39). Możliwość serologicznego potwierdzenia gruźlicy badaniem poziomu przeciwciał w różnych płynach ustrojowych, na przykład w płuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (BALF), płynie opłucnowym (PO) i mózgowo-rdzeniowym (PMR) miałyby również istotne znaczenie praktyczne (32, 40, 41).

Metody serologiczne w rozpoznawaniu gruźlicy próbowano stosować od kilkudziesięciu lat (42). Pierwszą próbę podjął Arloing w roku 1898, czyli ponad 100 lat temu. Wykazał on obecność w surowicy przeciwciał aglutynujących. Przeciwciała te były obecne u 57% chorych na gruźlicę i jedynie u 11% nie chorujących na gruźlicę (43). Od tego czasu próbowano opracować wiele testów, ale żaden z nich nie zyskał szerokiej akceptacji ze względu na zbyt niską czułość i swoistość. Głównym problemem był brak antygeny prątka odpowiedniego do badań serologicznych. Pierwotnie stosowane przesącze z hodowli prątków, tuberkulina i nieoczyszczone lizaty komórek bakteryjnych okazały się nieprzydatne do celów diagnostycznych, ponieważ u ludzi zdrowych, osób szczepionych BCG, czy też u chorych na inne choroby także wykrywano obecność przeciwciał przeciwko tym antygenom (42, 44, 45). Ogromnym problemem był również brak powtarzalności wyników spowodowany trudnościami w standaryzacji wyciągów antygenowych. Większość ludzi od urodzenia ma kontakt z niechorobotwórczymi prątkami, saprofitami rozpowszechnionymi w środowisku (glebie, wodzie). Prątki te nie wywołują choroby, ale indukują produkcję przeciwciał reagujących krzyżowo z antygenami *M. tuberculosis* (42). Aby wyeliminować wyniki nieswoiście dodatnie, próbowano uzyskać oczyszczone antygeny występujące jedynie w organizmie prątków gruźlicy. Początkowo rozdziału antygenów dokonywano metodą elektroforezy w żelu, dzieląc

je według masy cząsteczkowej. Rozwój technik molekularnych doprowadził do sklonowania genów dla poszczególnych antygenów *M. tuberculosis*, wbudowanie ich do genomu *E. coli*, co umożliwiło otrzymanie rekombinowanych polipeptydów odpowiadających niektórym antygenom prątka (46). Obecnie w banku rekombinowanych białek WHO znajduje się kilkanaście sklonowanych produktów genów *M. tuberculosis*. Szereg spośród nich próbowano wykorzystać do celów diagnostycznych, w tym antygeny: 38 kDa, 16 kDa, 19 kDa, 30/31 kDa, 65 kDa, 14 kDa, 45 kDa (42, 47, 48). Najbardziej obiecującym antygenem w diagnostyce wydaje się być obecnie antygen 38 kDa. Białko to wchodzi w skład opisanego przez Daniela i Andersona antygeny 5 (48) i reaguje z opisanymi przez Coatesa i wsp. (15) przeciwciałami monoklonalnymi TB71 i TB72. Białko 38 kDa jest antygenem dominującym – gatunkowo swoistym jedynie dla *Tuberculosis complex* (30,57,51). Sklonowanie genu dla białka 38kDa przez Andersona i Hensena ułatwiło jego powszechną dostępność (35). W kilku badaniach prospektywnych stwierdzono, że czułość testu z użyciem 38kDa wynosi 49-89% natomiast swoistość 98-100% (14, 32, 40, 47, 49, 50, 51, 52). Antygen ten występuje jedynie u bakterii z grupy *Tuberculosis complex*, nie wykrywa się go w organizmie prątków niegruźliczych (14, 53, 46). Ekspresja tego antygeny przez szczep BCG jest 10 razy słabsza niż przez *M. tuberculosis*, co oznacza, że szczepienia nie powinny wpływać na poziom przeciwciał (49). Sugeruje się również, że łączna ocena odpowiedzi humoralnej na antygen 38 kDa w połączeniu z innymi rekombinowanymi antygenami prątka (16 kDa, 14 kDa, 19 kDa) może poprawić czułość testów nie wpływając na ich swoistość (32).

Antygen 16 kDa jest również rekombinowanym, swoistym dla *Tuberculosis complex* i immunodominującym antygenem *M. tuberculosis*. Jest on strukturalnie homologiczny z białkami należącymi do rodziny białek szoku termicznego o niskiej masie cząsteczkowej (54). Powszechnie uważa się, że łączne zastosowanie antygeny 38kDa i 16 kDa może poprawić czułość testów serologicznych w gruźlicy (55, 56).

Antygenem powszechnie stosowanym w diagnostyce serologicznej gruźlicy jest A60. Antygen ten początkowo określany jako ciepłostały wielkocząsteczkowy antygen (thermostabile macromolecular antigen), stanowi kompleks zawierający lipidy, białka i węglowodany (57, 58, 59, 60). Jest makrocząsteczką obecną w cytozolu zarówno typowych jak i atypowych prątków oraz w tuberkulinie (61, 62, 63). Otrzymany został w 1986 roku przez Cocito

z *Mycobacterium bovis* BCG (58). Zawiera w swym składzie około 30 białek, ale tylko 8% z nich jest swoistych dla gatunku *M. tuberculosis* (59). Jest to immunodominujący antygen i około 85% przeciwciał syntetyzowanych w trakcie choroby jest skierowanych przeciwko białkom wchodzącym w skład A60 (57). A60 jest obecny w cytozolu zarówno prątków gruźlicy jak i prątków niegruźliczych, w tym także *M. leprae*, oraz w tuberkulinie i w komórkach bakterii z rodzaju *Nocardia* i *Corynebacteria* (60, 64).

Wartość diagnostyczna testów serologicznych zależy nie tylko od zastosowanego antygeny, ale również od metodyki badania. Pierwsze testy serologiczne bazowały na prostych a zarazem niezbyt dokładnych metodach aglutynacji, precypitacji i immunodyfuzji (44, 45, 65). Sytuacja zmieniła się po roku 1972, gdy Engvall i Perlmann opisali technikę immunoenzymatyczną (ELISA) (65). W 1976 Nassau i współpracownicy po raz pierwszy zastosowali technikę ELISA w diagnostyce gruźlicy (65). Największą trudnością był wybór antygeny prątka do badań serologicznych. Swoistość testów z użyciem mieszaniny antygenów jest na ogół zbyt niska, aby je stosować w rutynowej praktyce. Swoistość wzrasta przy zastosowaniu antygenów oczyszczonych, choć czułość testów bazujących na pojedynczych antygenach jest obniżona, gdyż nie wszyscy chorzy odpowiadają na każdy antygen. Dlatego idealny antygen powinien być swoisty gatunkowo i dominujący, czyli wywołujący odpowiedź humoralną u większości chorych.

Testy serologiczne próbowano stosować w diagnostyce gruźlicy od kilkadziesiąt lat. Jednak dopiero w ostatnim dziesięcioleciu udało się wyizolować, oczyścić oraz uzyskać metodą rekombinacji genetycznej poszczególne antygeny prątka, co stworzyło nowe możliwości badawcze dla oceny odpowiedzi humoralnej w gruźlicy (49, 66). Przeprowadzono szereg prac badawczych oceniających przydatność testów immunoenzymatycznych, wykrywających swoiste przeciwciała przeciwprątkowe w diagnostyce gruźlicy, jednakże otrzymane wyniki były bardzo rozbieżne (14, 32, 50, 61, 67).

W piśmiennictwie polskim prace dotyczące zagadnień związanych z serologią gruźlicy są nieliczne (44, 45, 68, 69, 70). Pionierskie badania nad wykrywaniem przeciwciał przeciwprątkowych u chorych na gruźlicę rozpoczęła przed 30 laty Rowińska i wsp. (44, 45). Badania przeprowadzono metodą precypitacji stosując antygeny nieoczyszczone. Wykazano obecność przeciwciał przeciwprątkowych u chorych z czynną gruźlicą oraz zależność pomiędzy czasem trwania i masowością ekspozycji na antygeny prątka a odpowiedzią humoralną (45). W latach dziewięćdziesiątych Kaczmarek i wsp. (68) zastosowali metodę immunofluorescencji do oceny przydatności testów serologicznych w rozpoznawaniu gruźlicy. Grubek-Jaworska i wsp. (69) jako pierwsi w Polsce zastosowali metodę immunoenzymatyczną do oznaczania przeciwciał przeciwprątkowych zarówno w surowicy jak i w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego. Siemińska i wsp. (70) ocenili metodę serologiczną (IgG anty A60) w diagnostyce różnicowej guza płuca. Autorzy ci stwierdzili, że testy serologiczne mogą być stosowane jako metoda wspomagająca różnicowanie guzów płuca, jednakże wyniki fałszywie ujemne oraz fałszywie dodatnie ograniczają jej przydatność (70).

Rozbieżności wyników uzyskanych przez różnych autorów mogą świadczyć o istotnej zależności odpowiedzi immunologicznej na antygeny prątka od czynników genetycznych, osobniczych a także geograficzno-środowiskowych (9, 10, 71, 72). Zjawisko to potwierdza również duża zmienność skuteczności szczepionki BCG w zależności od populacji badanej i szerokości geograficznej (73). Czynnikiem modyfikującym odpowiedź immunologiczną w skali populacyjnej może być również fakt sporadycznego, endemicznego bądź epidemicznego występowania gruźlicy w danym regionie (73, 74). Badania przeprowadzone w danej populacji, na odpowiednio dobranej, dużej grupie chorych pozwolą na ocenę zarówno zjawisk uniwersalnych jak i specyficznych dla wybranych populacji.

Cel pracy

Celem pracy była:

1. Ocena odpowiedzi humoralnej na antygeny prątka u chorych na różne postaci gruźlicy płuc i gruźlicy pozapłucnej, zarówno u dorosłych jak i u dzieci.
2. Ocena zależności pomiędzy różnymi parametrami osobniczymi i związanymi z przebiegiem choroby a rodzajem i nasileniem odpowiedzi humoralnej.
3. Ocena przydatności testów serologicznych do rozpoznawania różnych postaci gruźlicy w populacji polskiej.

Material

Badanym materiałem była surowica, płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn osierdziowy oraz płyn opłucnowy. Badany materiał pochodził od 1037 osób. Wszystkie osoby były w przeszłości poddane szczepieniom BCG. W żadnym przypadku nie wykryto zakażenia wirusem HIV. Chorzy hospitalizowani byli w latach 1997-2002 w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, Oddziale Gruźlicy Kości i Stawów Szpitala Ortopedyczno-Urazowego PSK Nr 2 w Otwocku, Oddziale Dziecięcym Szpitala Chorób Płuc i Gruźlicy w Otwocku, Klinice Pneumonologii, Alergologii i Hematologii Dziecięcej Akademii Medycznej w Warszawie, Szpitalu Gruźlicy i Chorób Płuc ul. Pasteura w Warszawie oraz w Oddziale Gruźlicy Układu Moczowego Specjalistycznego Szpitala w Tuszyńku k/Łodzi.

Surowica

Przebadano surowice pochodzące od 791 osób, w tym od 563 osób dorosłych (tabela I) i od 228 dzieci (tabela II).

1. Gruźlica

W grupie 462 chorych na gruźlicę było 350 osób dorosłych (tabela I) oraz 112 dzieci (poniżej 18 roku życia) (tabela II).

1.1 Gruźlica dorosłych

Chorych podzielono na 2 podgrupy – gruźlica płuc (269 osób) oraz gruźlica pozapłucna (81 osób). W chwili pobrania krwi większość chorych na gruźlicę, z wyłączeniem grupy chorych przewlekłe prątkujących, było nieleczonych, jedynie 32 osoby otrzymywały leki przeciwprątkowe przez okres krótszy niż 1 miesiąc. W badanej grupie 35 chorych było leczonych doustnymi kortykosteroidami. Kortykosteroidy były zastosowane u niektórych chorych na gruźlicę pozapłucną (gruźlicze zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu, gruźlica opłucnej, gruźlica nadnerczy) a także u kilku chorych z ciężkimi, zagrażającymi życiu, rozległymi zmianami w obrębie płuc.

Tabela I Charakterystyka grupy dorosłych, u których poziom przeciwciał przeciwprątkowych oceniono w surowicach.

Rozpoznanie	liczba chorych	płeć K/M	średni wiek	rozpiętość wieku
Gruźlica płuc	269	94/175	44,7	19-90
Gruźlica pozapłucna	81	31/59	53,9	22-77
Mykobakteriozy (MOTT)	20	10/10	56,6	27-73
Sarkoidoza	86	36/50	42,7	23-62
Niegruźlicze zakażenia	67	31/36	54,1	19-77
Nowotwory	41	15/26	59,8	27-85
Zdrowi	58	39/19	48,6	31-70

Tabela II Charakterystyka grupy dzieci, u których poziom przeciwciał przeciwprątkowych oceniono w surowicach.

Rozpoznanie	Liczba chorych	Płeć K/M	Średni wiek	Rozpiętość wieku
Gruźlica	112	49/63	8,4	0,1-18
Zakażenie prątkiem	30	16/14	9,1	3-18
Kontrola	82	38/44	7,9	0,1-18

1.1.1 Gruźlica płuc

Wszystkich chorych na gruźlicę płuc podzielono na podgrupy celem oceny odpowiedzi humoralnej w różnych sytuacjach klinicznych.

W grupie chorych na gruźlicę płuc było 150 nowych przypadków (wywiad chorobowy krótszy niż 6 miesięcy), 68 chorych ze wznową procesu gruźliczego oraz 51 chorych przewlekle prątkujących od co najmniej roku (chroników). Grupa chroników to grupa z wieloletnim wywiadem chorobowym, zwykle po wielu próbach niesystematycznego leczenia przeciwprątkowego, w większości wypadków chorzy wydalający prątki odporne na podstawowe leki przeciwprątkowe. W grupie chorych zdefiniowanych jako wznowa procesu gruźliczego pełne leczenie przeciwprątkowe zakończono w przeszłości i chorzy ci zostali uznani za wyleczonych przez lekarza prowadzącego. Rozpoznanie potwierdzono bakteriologicznie u 133 chorych (61%) z grupy nowych przypadków lub chorych ze wznową. W pozostałych przypadkach gruźlicę rozpoznano na podstawie objawów kliniczno-radiologicznych oraz odpowiedzi na leczenie przeciwprątkowe. U wszystkich chorych z tej grupy rozpoznanie zweryfikowano po długotrwałej obserwacji. W celu porównania odpowiedzi humoralnej u chorych na różne postaci gruźlicy dokonano podziału chorych na następujące podgrupy: gruźlica naciekowa, włóknisto-jamista, serowate zapalenie płuc i postać rozsiana. Ze względu na rozległość zmian w ocenie radiologicznej chorych podzielono na przypadki z zajęciem jednego pola płucnego, dwóch oraz

trzech i więcej pól płucnych. Podziału obrazu radiologicznego każdego płuca na trzy pola dokonano na poziomie przyczepu drugiego i czwartego żebra. Kompletnie informacje na temat postaci gruźlicy, rozległości zmian radiologicznych, przebiegu choroby oraz wyników badań bakteriologicznych były dostępne u 215 chorych. Grupę tę poddano wieloczynnikowej analizie regresji badającej wpływ powyższych czynników na odpowiedź humoralną.

1.1.2 Gruźlica pozapłucna

Grupa chorych na gruźlicę pozapłucną (81 chorych) obejmowała 30 chorych na gruźlicę kości i stawów, 11 chorych na gruźlicę nerek, 10 chorych na gruźlicę obwodowych węzłów chłonnych, 1 chorego na gruźlicę nadnerczy, 7 chorych na gruźlicę ośrodkowego układu nerwowego, 22 chorych na gruźlicę opłucnej.

Wśród 30 przypadków gruźlicy narządu ruchu było 23 chorych na gruźlicę kręgosłupa, 5 chorych na gruźlicę stawu biodrowego, oraz 2 chorych na gruźlicę stawu skokowego. Rozpoznanie gruźlicy kości potwierdzono badaniem histologicznym u 20 chorych (ziarnina gruźlicza z obecnością martwicy serowatej) oraz metodą bakteriologiczną (posiew materiału pobranego w czasie zabiegu operacyjnego) u 8 z nich. U 10 chorych gruźlica narządu ruchu była rozpoznana jedynie na podstawie obrazu kliniczno-radiologicznego. Współistnienie gruźlicy innych narządów potwierdzono u 14 chorych (46.7%). We wszystkich przypadkach była to gruźlica płuc, w 9 przypadkach aktywna popierwotna a w 5 przypadkach zmiany po przebytej gruźlicy. U 2 chorych rozpoznano dodatkowo gruźlicę najądrza, u jednej osoby gruźlicę nerek i w 1 przypadku gruźlicę opłucnej.

Wszystkie przypadki gruźlicy układu moczowego były potwierdzone bakteriologicznie metodą posiewu moczu na podłożu Löwenstein-Jensena.

Gruźlicę obwodowych węzłów chłonnych rozpoznano na podstawie wywiadu epidemiologicznego, obrazu klinicznego oraz wyniku odczynu tuberkulinowego, po wykluczeniu innych przyczyn limfadenopatii, oraz potwierdzono metodą histopatologiczną (stwierdzenie obecności ziarniny z cechami

serowacenia). W 2 przypadkach ze zmienionych chorobowo węzłów chłonnych wyhodowano prątki gruźlicy. W 8 przypadkach współistniała czynna gruźlica płuc.

Gruźlicę ośrodkowego układu nerwowego rozpoznano na podstawie objawów klinicznych, badania ogólnego płynu mózgowo-rdzeniowego (limfocytarna pleocytoza powyżej 5 komórek/ μ l i podniesiony poziom białka powyżej 500mg/l), po wykluczeniu innych przyczyn zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Rozpoznanie potwierdzono hodowlą płynu mózgowo-rdzeniowego metodą Bactec u 2 chorych. U 5 chorych wykryto obecność materiału genetycznego prątka gruźlicy metodą PCR. Gruźlica płuc współistniała u 1 chorego.

Gruźlicę opłucnej rozpoznano na podstawie wywiadu, objawów kliniczno-radiologicznych, po wykluczeniu innych przyczyn obecności płynu w opłucnej. Serowacujące ziarniniaki opłucnej wykryto u 4 chorych. U 2 chorych z płynu opłucnowego wyhodowano prątki metodą Bactec. W 16 przypadkach gruźlicy opłucnej towarzyszyły zmiany w mięszu płucnym. We wszystkich przypadkach gruźlicy pozapłucnej niepotwierdzonej bakteriologicznie rozpoznanie zweryfikowano po długotrwałej obserwacji chorych i po leczeniu przeciwprątkowym.

2. Grupa kontrolna – dorośli

Grupę kontrolną stanowiły osoby zdrowe oraz chore na inne niż gruźlica choroby układu oddechowego (tabela I). Do grupy kontrolnej dla gruźlicy pozapłucnej włączono chorych na niegruźlicze zakażenia odpowiednich narządów (układu kostno-stawowego, ośrodkowego układu nerwowego, osierdza). Sarkoidozę rozpoznano zgodnie z powszechnie przyjętymi kryteriami (75). Rozpoznanie bazowało na ocenie kliniczno-radiologicznej uzupełnionej badaniami czynnościowymi, potwierdzonej w większości wypadków badaniem morfologicznym wycinków oskrzeli, płuc, węzłów chłonnych lub skóry.

Rozpoznanie we wszystkich przypadkach nowotworu potwierdzono histologicznie. Stwierdzono następujące typy histologiczne nowotworu: rak drobnokomórkowy u 12 chorych, niedrobnokomórkowy u 12 chorych, gruczolowy u 6 chorych, płaskonabłonkowy u 7 chorych, wielkokomórkowy u 2 osób i chłoniak ograniczony do płuc i węzłów chłonnych klatki piersiowej u 2 badanych.

Mykobakteriozę rozpoznano zgodnie z przyjętymi kryteriami kliniczno-mikrobiologicznymi (76).

We wszystkich przypadkach wyhodowano prątki niegruźlicze: 8 przypadków *M. kansasii*, 4 przypadki *M. xenopi*, 4 przypadki *M. avium intracellulare*, 4 przypadki – szczep fotochromogenny bez dokładnego określenia gatunku.

Do grupy niegruźliczych zakażeń zaliczono 67 chorych na zapalenie płuc, z zaostrzeniami przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, grzybicą płuc, bakteryjnym ropniakiem opłucnej.

Większość grupy osób zdrowych stanowili pracownicy Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc. Osoby zdrowe w chwili pobrania krwi nie zgłaszały żadnych dolegliwości i miały prawidłowy obraz radiologiczny klatki piersiowej.

U wszystkich osób z grupy kontrolnej wykluczono czynną gruźlicę. Podstawą oceny był wywiad, badanie radiologiczne klatki piersiowej, a także u części chorych, badania bakteriologiczne i próba tuberkulinowa wykonywane z powodu różnicowania zmian chorobowych w klatce piersiowej. W grupie kontrolnej 26 osób otrzymywało kortykosteroidy ogólnie. Byli to głównie chorzy na sarkoidozę oraz pojedyncze przypadki chorych na inne choroby.

3. Gruźlica u dzieci

Przebadano materiał pochodzący od 228 dzieci poniżej 18 roku życia. U 112 dzieci rozpoznano gruźlicę: 41 przypadków gruźlicy ograniczonej do węzłów tchawiczo-oskrzelowych, 33 przypadki gruźlicy pierwotnej węzłowo-płucnej (z zajęciem węzłów chłonnych w klatce piersiowej i mięszu płucnego), 31 przypadków popierwotnej gruźlicy płuc, 3 przypadki gruźlicy opłucnej, 2 przypadki gruźlicy nerek, 2 przypadki gruźlicy rozsianej z zajęciem ośrodkowego układu nerwowego. Średnia wieku w grupie dzieci chorych na gruźlicę węzłów wynosiła 5,4 \pm 6 lat, w grupie gruźlicy węzłowo-płucnej 6,7 \pm 5,6 lat, a w popierwotnej gruźlicy płuc 14 \pm 5,7 lat. W chwili pobrania krwi żadne z dzieci nie otrzymywało leków przeciwprątkowych dłużej niż przez 1 miesiąc. Troje dzieci otrzymywało kortykosteroidy ogólnie (2 dzieci ze zmianami w ośrodkowym układzie nerwowym i 1 dziecko z gruźlicą opłucnej). Gruźlicę dziecięcą rozpoznano na podstawie wywiadu, obrazu kliniczno-radiologicznego, wyniku odczynu tuberkulinowego, bronchoskopii oraz badania bakteriologicznego popłuczyn oskrzelowych i/lub żołądkowych. W badanym materiale potwierdzenie bakteriologiczne uzyskano u 24 dzieci. We wszystkich przypadkach gruźlicy niepotwierdzonej bakteriologicznie rozpoznanie zweryfikowano po długotrwałej

obserwacji chorych i po leczeniu przeciwprątkowym. U 30 dzieci rozpoznano zakażenie prątkiem gruźlicy. Rozpoznanie było oparte na wywiadzie epidemiologicznym (bliski kontakt z osobą prątkującą) oraz wzmożonym odczynie tuberkulinowym (powyżej 15 mm), przy braku objawów klinicznych i prawidłowym obrazie radiologicznym klatki piersiowej. Dzieci z tej grupy były zakwalifikowane do profilaktycznego podawania izoniazydu.

4. Grupa kontrolna – dzieci

Grupę kontrolną (86 dzieci) stanowiły dzieci zdrowe, oraz chore na inne niż gruźlica choroby układu oddechowego (astma, pyłkowica, niegruźlicze zakażenia, wady wrodzone układu oddechowego) rozpoznane zgodnie z powszechnie przyjętymi kryteriami. We wszystkich przypadkach wykluczono gruźlicę. Wszystkie dzieci poddane zostały szczepieniom BCG zgodnie z obowiązującym kalendarzem szczepień.

Płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF)

Przebadano materiał pochodzący od 179 osób. W tej grupie było 56 przypadków gruźlicy płuc, 74 chorych na niegruźlicze zakażenia układu oddechowego, 19 chorych na raka płuca, 14 chorych na sarkoidozę i 14 chorych na mykobakteriozy oraz 2 osoby zdrowe. Wszystkie przypadki gruźlicy płuc dotyczyły osób dorosłych. Rozpoznanie gruźlicy potwierdzono bakteriologicznie metodą hodowli (Bactec) u 39 chorych. W pozostałych przypadkach chorobę rozpoznano na podstawie kryteriów kliniczno/radiologicznych. Pozostałe choroby (grupa kontrolna) rozpoznano zgodnie z kryteriami opisanymi powyżej.

Płyn mózgowo-rdzeniowy (PMR)

Płyn mózgowo-rdzeniowy pochodził od 30 chorych. W tym 16 chorych na gruźlicę ośrodkowego układu nerwowego i 14 chorych na niegruźlicze zakażenia ośrodkowego układu nerwowego. We wszystkich przypadkach gruźlica OUN została potwierdzona za pomocą hodowli oraz metodą PCR. Niegruźlicze zakażenia ośrodkowego układu nerwowego rozpoznano na podstawie badania ogólnego i badania bakteriologicznego płynu mózgowo-rdzeniowego.

Płyn osierdziowy

Przebadano materiał pochodzący od 17 chorych. W tym 6 chorych na gruźlicę osierdzia, 5 chorych na wirusowe zapalenie osierdzia, 6 chorych na raka płuca z naciekaniami osierdzia. Raka płuca we wszystkich przypadkach rozpoznano na podstawie badania histologicznego. Wirusowe zapalenie osierdzia potwierdzono serologicznie. Gruźlicę osierdzia potwierdzono bakteriologicznie u 2 chorych. W pozostałych przypadkach gruźlicę rozpoznano na podstawie obrazu kliniczno-radiologicznego i echokardiograficznego, ogólnego badania płynu osierdziowego, wyniku odczynu tuberkulinowego i po wykluczeniu innych przyczyn zapalenia osierdzia. Rozpoznanie zweryfikowano po leczeniu przeciwprątkowym.

Płyn opłucnowy

Zbadano materiał pochodzący od 20 chorych. W tym 7 chorych na gruźlicę opłucnej, 10 chorych na niegruźlicze zakażenia układu oddechowego i 3 chorych na raka płuca. Gruźlica opłucnej była potwierdzona bakteriologicznie metodą posiewu u 2 chorych. W pozostałych przypadkach gruźlicę opłucnej rozpoznano na podstawie kryteriów kliniczno-radiologicznych oraz zweryfikowano po zakończeniu leczenia. Gruźlica płuc współistniała z gruźlicą opłucnej w 4 przypadkach. Raka płuca we wszystkich przypadkach rozpoznano na podstawie badania histopatologicznego. Zakażenia niegruźlicze rozpoznano na podstawie badania kliniczno-radiologicznego, badań mikrobiologicznych oraz odpowiedzi na antybiotykoterapię.

Metody

Krew pobraną na skrzep wirowano 3000 obr/min przez 15 minut. BALF, PMR, płyn osierdziowy i opłucnowy wirowano 2000 obr/min przez 15 minut. Surowicę lub nadsącz porcjowano i zamrażano w temperaturze -40°C . Do oznaczeń metodą ELISA używano surowic/nadsączy świeżo rozmrożonych. Testy paskowe wykonywano w świeżo odwirowanych próbkach surowic. Zastosowano 6 różnych testów opartych na metodzie immunoenzymatycznej oraz jeden test immunochromatograficzny.

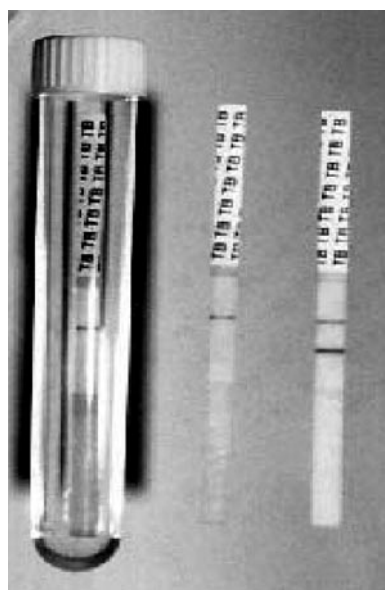
Testy immunoenzymatyczne wykrywały następujące przeciwciała:

- IgG anty 38kDa (Pathozyme tb complex, Omega Diagnostics Scotland),
- IgG anty 38kDa + 16 kDa (Pathozyme tb complex plus, Omega Diagnostics Scotland),
- IgG anty A60 (Immunozyne®Mycobacterium, Immuno),
- IgG anty 38kDa + LAM (Mycog, Omega Diagnostics Scotland),
- IgA anty 38kDa + LAM (MycogA, Omega Diagnostics Scotland),
- IgM anty 38kDa + LAM (MycogM, Omega Diagnostics Scotland),

Test immunochromatograficzny (paskowy) służył do wykrywania przeciwciał IgG przeciwko antygenowi 38kDa (Rapid test tb, Quorum Diagnostics, Kanada). Testem paskowym badano jedynie surowice.

Technika wykonania testu immunochromatograficznego polegała na zanurzeniu w 100 μl badanej surowicy paska bibuły zawierającego antygen utrwalony koloidalnym złotem. Po 15 minutach dokonywano odczytu testu. Dwa równoległe fioletowe prążki w środkowej części paska oznaczały wynik dodatni, pojedynczy barwny prążek kontrolny wskazywał na wynik ujemny (rycina 2).

W przypadku zestawów ELISA antygeny prętka: A60, 38 kDa, 38kDa i 16kDa, 38kDa i LAM były opłaszczane na 96-dołkowej mikroplycie, na którą nanoszono badane surowice. Obecne w surowicy swoiste przeciwciała wiązały się z antygenem, a następnie dodawano przeciwciała mostowe anty-IgG (IgA lub IgM) znakowane enzymatycznie i substrat, który uruchamiał reakcję barwną. Natężenie tej reakcji było mierzone przy użyciu czytnika spektrofotometrycznego ELX 800 firmy Biotec. W zależności od rodzaju testu wynik prezentowano jako indeks gęstości optycznej (półilościowo) lub w jednostkach (ilościowo). Testy Pathozyme tb complex i MycoM pozwalały jedynie na ocenę półilościową. Każdy wynik porównywano do wyniku gęstości optycznej próbki kontrolnej. Otrzymany w ten sposób indeks pozwalał na porównanie wyników różnych oznaczeń. Pozostałe testy były testami ilościowymi. Na podstawie gęstości optycznych próbek standardowych wyznaczano krzywą standardową i na jej podstawie obliczano miano przeciwciał w próbce. Wszystkie oznaczenia wykonano zgodnie z zaleceniami producentów testów. Poziom odcięcia pomiędzy wynikami uznanymi za dodatnie a ujemnymi dla danej populacji wyznaczano na podstawie krzywej ROC.



Rycina 2. Test immunochromatograficzny – wynik ujemny i dodatni.

Ocena statystyczna

Miana przeciwciał były porównane za pomocą testu U Manna-Whitneya dla rozkładu nienormalnego lub testem t-Studenta w przypadku rozkładu normalnego (dla porównania dwóch grup) oraz analizy wariancji (w przypadku konieczności porównania wyników w więcej niż dwóch grupach). Znamienność statystyczna została uznana na poziomie istotności $p < 0,05$. W przypadku uzyskania w analizie wariancji wyniku istotnego statystycznie, w celu zidentyfikowania grup różniących się w sposób istotny, stosowano test porównań wielokrotnych Tukeya. Wielowymiarową analizę czynników wpływających na poziom przeciwciał przeprowadzono w oparciu o analizę regresji. Przy braku normalności rozkładu wyników testów w obliczeniach stosowano transformację logarytmiczną. Obliczenia przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego S-PLUS 2000 (77). Czulość, swoistość, wartość predykcji dodatniej i ujemnej były liczone standardowymi metodami (78). Poziomy odcięcia były wyznaczone na podstawie krzywych ROC (receiver operating characteristic). Krzywa ROC opisuje prawdopodobieństwo prawidłowych i nieprawidłowych wyników dla różnych poziomów odcięcia (79). Aby wykreślić krzywą ROC frakcja wyników prawdziwie dodatnich (czulość) i fałszywie dodatnich (1 minus swoistość) były obliczone dla różnych poziomów odcięcia i naniesione na wykres. Pole pod krzywą ROC jest miarą dokładności testu. Punkt, który obejmuje największe pole wykresu jest uważany za najwłaściwszy poziom odcięcia (79).

Wyniki

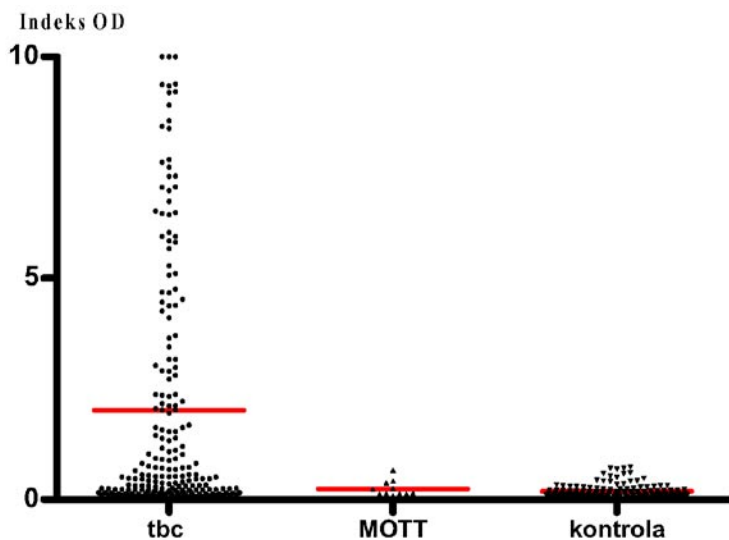
Odpowiedź humoralną oceniono w grupie wszystkich chorych na gruźlicę powyżej 18 roku życia w porównaniu do kontroli. Kolejno dokonano analizy w wybranych podgrupach: w gruźlicy płuc u dorosłych, gruźlicy pozapłucnej u dorosłych, w gruźlicy u dzieci. Porównano odpowiedź immunologiczną dla różnych antygenów prątka i w obrębie różnych klas immunoglobulin. W grupie chorych na gruźlicę płuc dokonano jedno i wielowymiarowej analizy czynników (osobniczych oraz związanych z przebiegiem choroby) mogących wpływać na odpowiedź humoralną. Oceniono wartość diagnostyczną badanych testów w rozpoznawaniu różnych postaci gruźlicy. Oceniono również wyniki testu immunochromatograficznego oraz poziomy przeciwciał w płynie BALF, osierdziowym, opłucnowym i mózgowo-rdzeniowym.

1. Gruźlica u dorosłych – analiza wszystkich przypadków łącznie

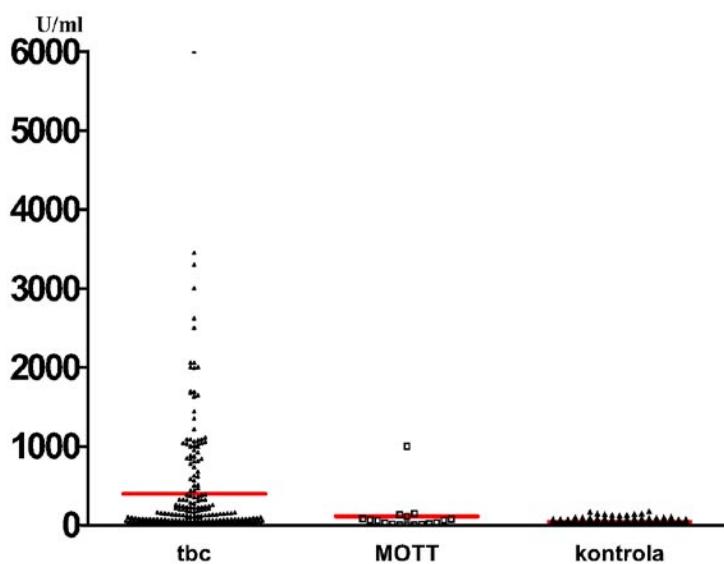
Prezentowane wyniki są zbiorczym zestawieniem poziomów przeciwciał u wszystkich dorosłych, u których rozpoznano gruźlicę w porównaniu do wszystkich osób z grupy kontrolnej. W skład grupy kontrolnej zaliczono osoby zdrowe oraz chorych na inne niż gruźlica choroby łącznie. Z grupy kontrolnej wyłączono chorych na mykobakteriozy i zaprezentowano osobno porównując tę grupę zarówno do chorych na gruźlicę jak i do grupy kontrolnej. Obliczono i porównano średnie poziomy przeciwciał przeciwprątkowych przeciwko badanym antygenom w grupie chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy kontrolnej. Wyniki poszczególnych testów przedstawiono w postaci skategramów.

Dla przeciwciał klasy IgG anty 38-kDa średni poziom przeciwciał, mierzony jako indeks gęstości optycznej, w grupie chorych na gruźlicę wynosił $2,02 \pm 2,73$ i był znamienne wyższy ($p < 0,0001$) w stosunku do grupy kontrolnej ($0,19 \pm 0,14$) oraz w stosunku do chorych na mykobakteriozy ($0,24 \pm 0,18$). Różnica pomiędzy grupą MOTT a grupą kontrolną była niezamienna (rycina 3).

W przypadku przeciwciał klasy IgG anty 38+16-kDa średnie miano przeciwciał dla chorych na gruźlicę wynosiło $397,7 \pm 47$ U/ml, a dla grupy kontrolnej $43,72 \pm 2,8$ U/ml. Różnica była istotna ($p < 0,0001$). Poziom przeciwciał w grupie chorych na mykobakteriozy (MOTT) wynosił $114,7 \pm 80,8$ U/ml. Różnica pomiędzy grupą gruźlicy a grupą MOTT była niezamienna, natomiast obserwowano istotną różnicę



Rycina 3. Poziom przeciwciał IgG anty 38-kDa w grupie osób dorosłych chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy chorych na mykobakteriozy i do grupy kontrolnej.



Rycina 4. Poziom przeciwciał IgG anty 38 + 16-kDa w grupie osób dorosłych chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy chorych na mykobakteriozy i do grupy kontrolnej.

między grupą MOTT a grupą kontrolną ($p < 0,01$). Na podwyższony średni poziom przeciwciał w grupie MOTT wpłynął bardzo wysoki wynik u jednego chorego (rycina 4). Średni poziom przeciwciał w grupie MOTT z wyłączeniem pojedynczego wysokiego wyniku wynosił $34,17 \pm 40,8$ U/ml i nie różnił się istotnie od średniej grupy kontrolnej.

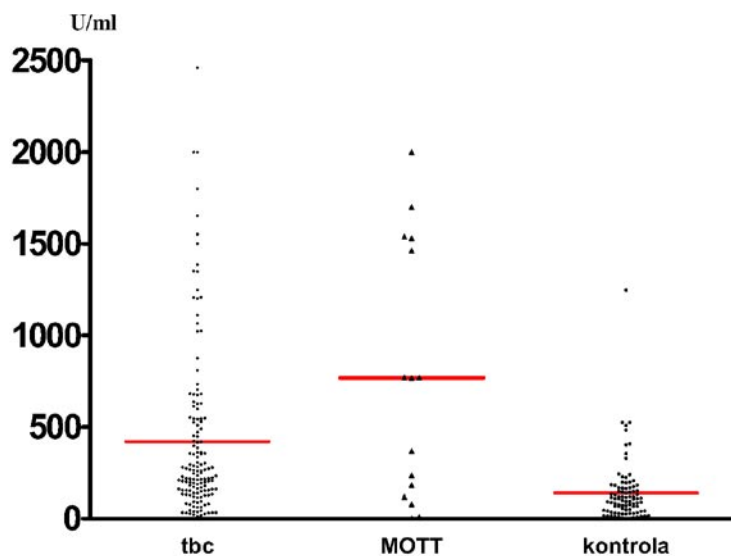
Średnie miano przeciwciał klasy IgG anty 38-kDa + LAM w grupie gruźlicy wynosiło 421 ± 38 U/ml i było istotnie wyższe od grupy kontrolnej – 139 ± 17 U/ml ($p < 0,0001$). Miano przeciwciał w grupie MOTT wynosiło 728 ± 284 U/ml i było znamienne wyższe od kontroli ($p < 0,01$). Nie stwierdzono różnicy statystycznie istotnej pomiędzy grupą MOTT a gruźlicą. Na bardzo wysokie średnie miano w MOTT wpłynęły wysokie wyniki u 3 chorych oraz fakt, że grupa chorych była nieliczna (rycina 5).

Średnie miano przeciwciał klasy IgA anty 38-kDa + LAM w grupie gruźlicy wynosiło 470 ± 81 U/ml, w grupie MOTT 574 ± 548 U/ml, a w grupie

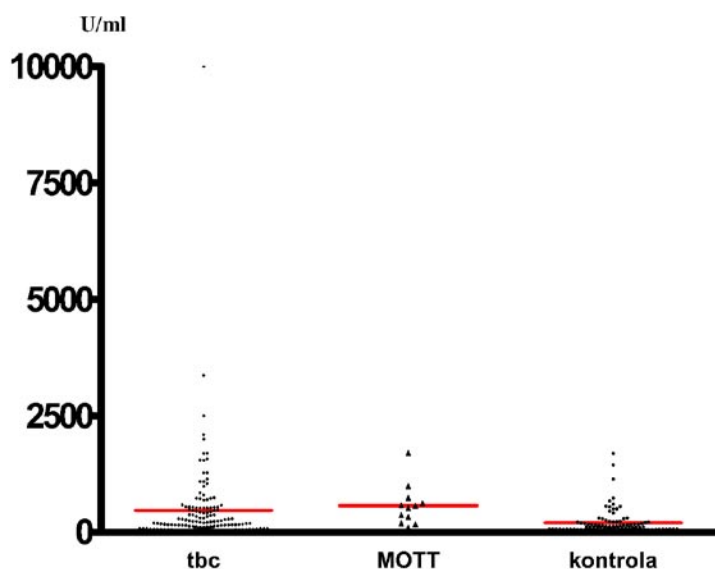
kontrolnej $202,9 \pm 22,5$ U/ml. Istotne różnice obserwowano pomiędzy grupą chorych na gruźlicę a grupą kontrolną ($p < 0,001$) oraz MOTT a kontrolą ($p = 0,01$). Na uwagę zasługuje fakt, iż podobnie jak w poprzednim przypadku, średnie miano u chorych na MOTT było wyższe niż w grupie gruźlicy. Zjawisko było spowodowane bardzo wysokim poziomem przeciwciał IgA u kilku chorych (rycina 6).

Średnie indeksy mian przeciwciał klasy IgM wynosiły dla grupy chorych na gruźlicę $0,77 \pm 0,05$; dla kontroli $0,57 \pm 0,05$ oraz dla grupy MOTT $0,95 \pm 0,18$. Różnica istotna statystycznie była obserwowana pomiędzy grupą gruźlicy a kontrolą ($p < 0,01$). Pozostałe różnice były nieznamienne (rycina 7).

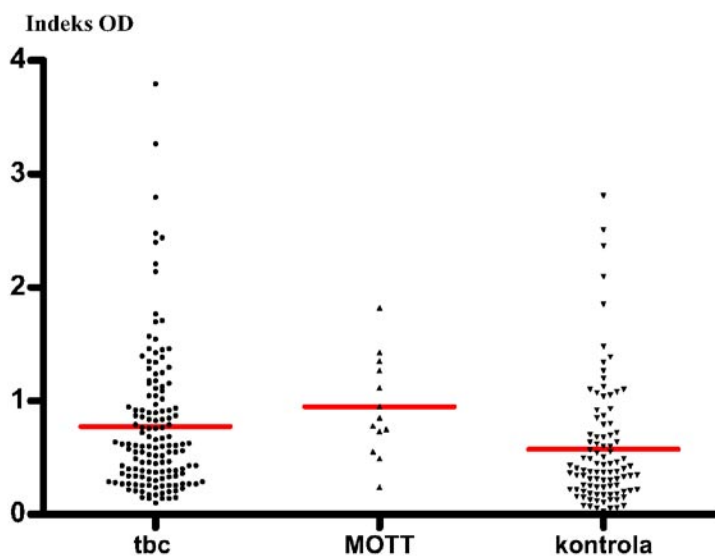
Średnie miana przeciwciał klasy IgG anty A60 były następujące: grupa gruźlicy – $459,2 \pm 91,4$ U/ml, grupa MOTT $267,4 \pm 113$ U/ml, kontrola $91,05 \pm 13$ U/ml. Różnica istotna statystycznie była obserwowana jedynie pomiędzy grupą gruźlicy a grupą kontrolną ($p < 0,0001$) (rycina 8).



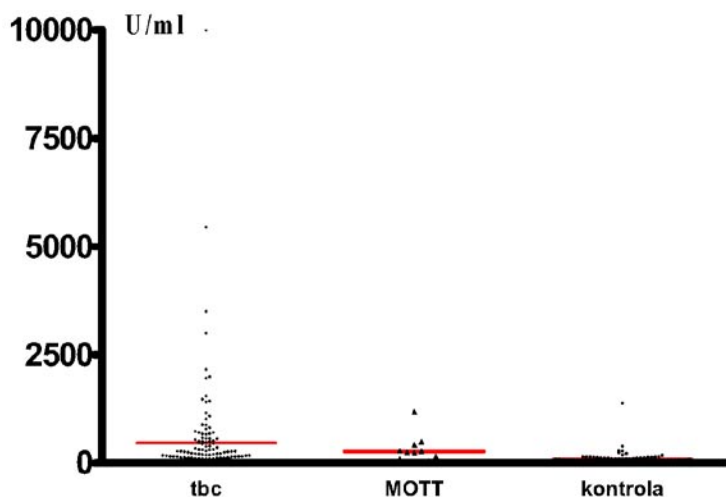
Rycina 5. Poziom przeciwciał IgG anty 38-kDa + LAM w grupie osób dorosłych chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy chorych na mykobakteriozy i do grupy kontrolnej.



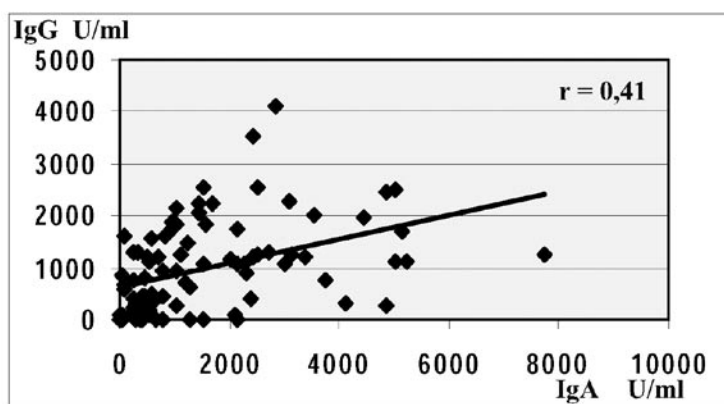
Rycina 6. Poziom przeciwciał IgA anty 38-kDa + LAM w grupie osób dorosłych chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy chorych na mykobakteriozy i do grupy kontrolnej.



Rycina 7. Poziom przeciwciał IgM anty 38-kDa + LAM w grupie osób dorosłych chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy chorych na mykobakteriozy i do grupy kontrolnej.



Rycina 8. Poziom przeciwciał IgG anty A60 w grupie osób dorosłych chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy chorych na mykobakteriozy i do grupy kontrolnej.



Rycina 9. Korelacja poziomów przeciwciał klasy IgG i IgA anty 38-kDa + LAM w grupie chorych na gruźlicę.

Porównano miana przeciwciał IgG, IgA i IgM anty 38-kDa + LAM u tych samych chorych. Obserwowano wysoce istotną korelację pomiędzy poziomem IgG i IgA anty 38-kDa + LAM (rycina 9), natomiast nie stwierdzono występowania korelacji pomiędzy IgM a pozostałymi klasami przeciwciał.

2. Gruźlica płuc u dorosłych

Wartości średnie indeksów gęstości optycznej (lub mian) przeciwciał w gruźlicy płuc w porównaniu do grupy kontrolnej oraz istotności statystyczne prezentuje tabela III.

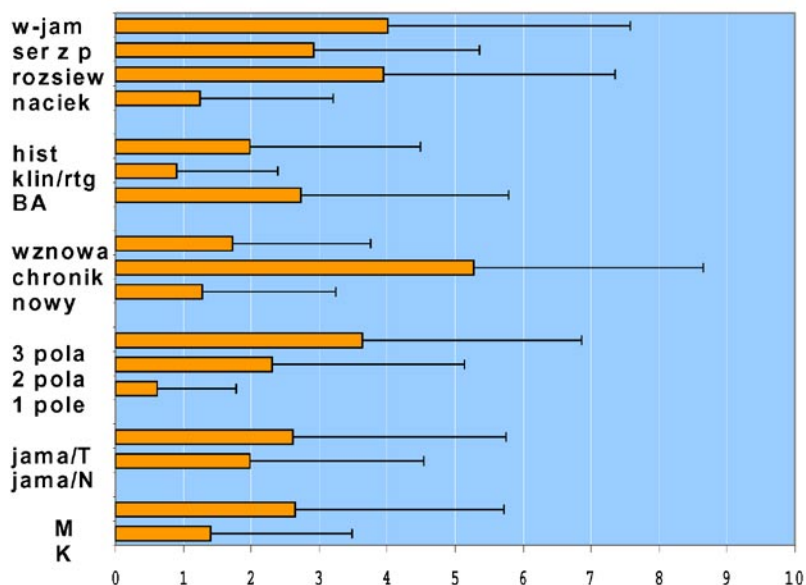
Tab. III. Średnie poziomy przeciwciał u dorosłych chorych na gruźlicę płuc oraz w grupie kontrolnej.

Test	Gruźlica płuc	Kontrola	Istotność statystyczna
IgG anty 38-kDa	2,26±0,21	0,19±0,14	p<0,0001
IgG anty 38+16-kDa	397±47 U/ml	43,72±2,8 U/ml	p<0,0001
IgG anty 38-kDa+LAM	296±33 U/ml	139±17 U/ml	p<0,05
IgA anty 38-kDa+LAM	618±111 U/ml	202,9±22,5 U/ml	p<0,001
IgM anty 38-kDa+LAM	1,12±0,11	0,57±0,05	<0,001
IgG anty A60	453±98 U/ml	91,05±13 U/ml	p<0,001

Średnia indeksów gęstości optycznej lub mian przeciwciał dla każdego z badanych testów była istotnie wyższa od grupy kontrolnej. Najmniejszą różnicę (na granicy istotności statystycznej) obserwowano dla testu bazującego na antygenie IgG anty 38-kDa+LAM. Największe różnice pomiędzy gruźlicą a kontrolą obserwowano w przypadku testów opartych na antygenach rekombinowanych.

Dla grupy 215 chorych na gruźlicę posiadano kompletny zbiór danych kliniczno-radiologicznych oraz osobniczych (wiek, płeć, czas trwania choroby, przebieg kliniczny, wyniki badań bakteriologicznych, rozległość radiologiczna zmian, obecność lub brak jamy). W tej grupie oceniono wpływ wyżej wymienionych czynników na odpowiedź humoralną. Przeprowadzono analizę jednowymiarową porównując różne zmienne tej samej kategorii, a następnie dokonano zbiorczej analizy regresji porównującej znaczenie poszczególnych zmiennych łącznie na odpowiedź humoralną na dany antygen i w danej klasie immunoglobulin.

Na produkcję przeciwciał IgG anty-38-kDa wpływały następujące czynniki: płeć, obecność prątkowania, przebieg kliniczny, postać choroby i rozległość radiologiczna zmian chorobowych. Średni indeks gęstości optycznej wynosił u mężczyzn 2,65, a u kobiet 1,41 ($p<0,01$). U chorych prątkujących średni indeks wynosił 2,74, u nieprątkujących 1,49 ($p<0,001$). W grupie nowych przypadków, choraków oraz chorych ze wznową średnie indeksy OD wynosiły odpowiednio: 1,38; 5,27 oraz 1,72. Różnica pomiędzy grupą choraków a oboma pozostałymi grupami była znamienna statystycznie ($p<0,001$). W postaci naciekowej OD indeks wynosił 1,24, w przypadku choroby rozsianej – 3,95, u chorych z serowatym zapaleniem płuc – 2,92, w postaci włóknisto-jamistej – 4,02. Różnica była znamienna statystycznie pomiędzy gruźlicą naciekową a wszystkimi trzema pozostałymi postaciami ($p<0,001$). Przy zajęciu jednego pola płucnego w badaniu radiologicznym średni indeks wynosił 0,62; przy zajęciu dwóch pól płucnych – 2,31, powyżej trzech pól – 3,63. Różnica pomiędzy wszystkimi grupami była wysoce istotna ($p<0,0001$) (rycina 10).



Ryc. 10. Średnie wartości indeksu IgG anty-38-kDa (wraz z odchyleniami standardowymi) w zależności od wybranych czynników. (w-jam – gruźlica włóknisto-jamista, ser z p – serowate zapalenie płuc, rozsiew – postać rozsiana, naciek – gruźlica naciekowa, hist – rozpoznanie potwierdzone histopatologicznie, klin/rtg – rozpoznanie na podstawie objawów kliniczno-radiologicznych, BA – rozpoznanie potwierdzone bakteriologicznie, wznowa – wznowa gruźlicy, chronik – grupa przewlekle prątkujących, nowy – grupa nowych przypadków, 1 (2, 3) pola – ilość zajętych pól płucnych, jama/T – grupa chorych z jamą, jama/N – grupa chorych bez jamy, M – mężczyzna, K – kobieta)

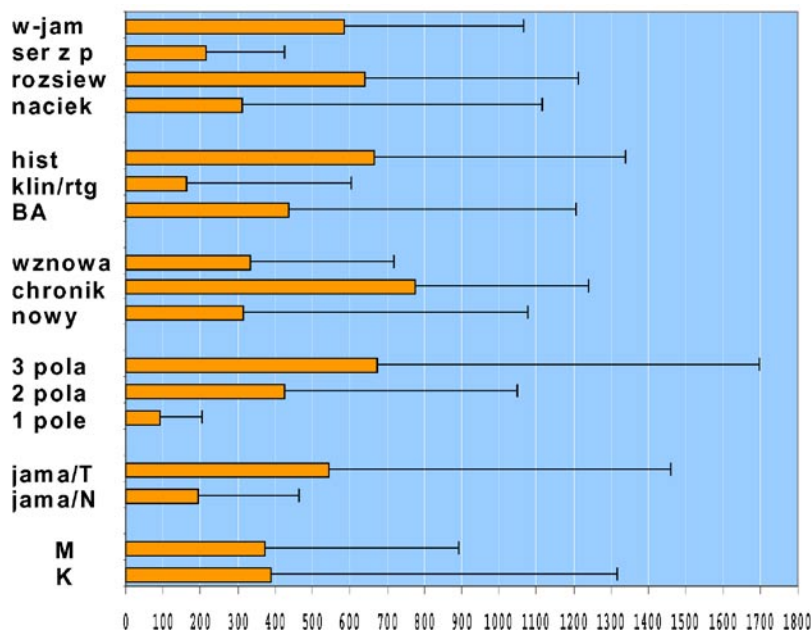
Na odpowiedź IgG anty-38 + 16-kDa wpływały następujące czynniki: obecność prątkowania, przebieg kliniczny, postać choroby, obecność lub brak jamy i rozległość radiologiczna. U chorych z rozpoznaniem potwierdzonym bakteriologicznie średnie miano wynosiło 437,15 U/ml, w grupie z rozpoznaniem kliniczno-radiologicznym – 163,21 U/ml ($p<0,001$). Średnie miano u chorych ze świeżo rozpoznaną chorobą wynosiło 313,97 U/ml, u choraków – 775,19 U/ml a u chorych ze wznową – 334,47 U/ml. Różnica pomiędzy grupą chroni-

ków a grupą nowych przypadków jest znamienna statystycznie ($p<0,001$). Średnie miano w grupach chorych z różnymi postaciami gruźlicy były następujące: gruźlica naciekowa – 312,64 U/ml, rozsiew – 640,15 U/ml, serowate zapalenie płuc – 218,68 U/ml, postać włóknisto-jamista – 584,47 U/ml. Różnica pomiędzy gruźlicą naciekową a rozsianą i włóknisto-jamistą była znamienna statystycznie ($p<0,001$). Przy zajęciu 1 pola płucnego średnie miano wyniosło 91,71 U/ml, przy zajęciu 2 pól płucnych – 424,82 U/ml, powyżej 3 pól – 674,79 U/ml. Różnica jest istotna pomiędzy wszystkimi grupami ($p<0,0001$). U chorych, u których stwierdzono obecność jamy średni indeks wynosił 543,46 U/ml, u chorych bez jamy 192,96 U/ml ($p<0,001$) (rycina 11).

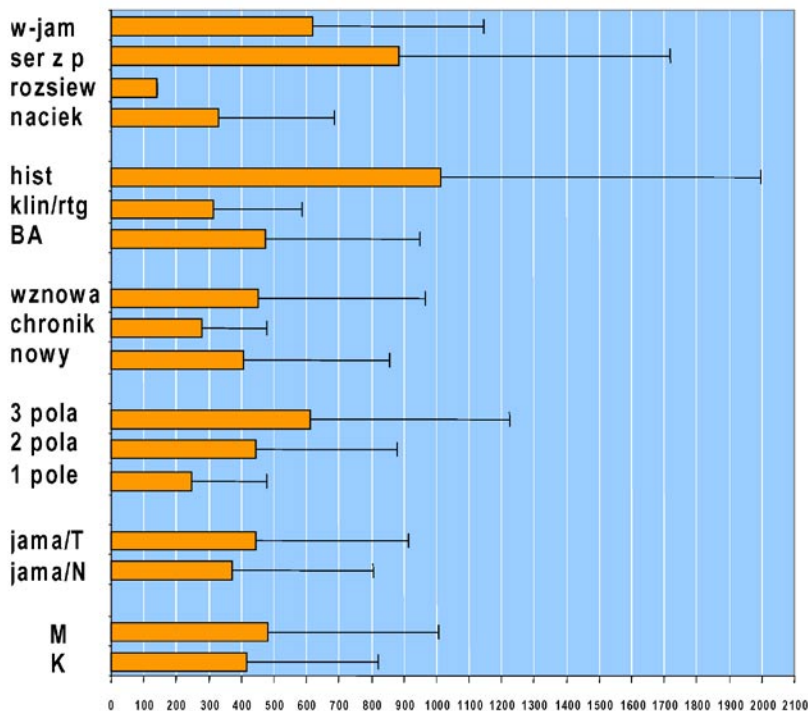
Na odpowiedź IgG anty-38-kDa + LAM wpływały jedynie 2 czynniki: postać choroby i rozległość radiologiczna. W postaci naciekowej średnie miano przeciwciał wynosiło 331,77 U/ml, w postaci rozsianej – 140,6 U/ml, w przypadku serowatego zapalenia płuc – 885,14 U/ml, w postaci włóknisto-jamistej – 620,27 U/ml. Różnica pomiędzy gruźlicą naciekową a włóknisto-jamistą była znamienna sta-

tystycznie ($p=0,003$). Przy zajęciu 1 pola płucnego średnie miano wynosiło 247,27 U/ml, 2 pól płucnych – 444,35 U/ml, powyżej 3 pól – 612,29 U/ml. Różnica pomiędzy grupą z zajęciem 1 polem a grupą chorych, u których zajęte były powyżej 3 pola była istotna ($p<0,01$) (rycina 12).

W przypadku klasy IgA anty-38-kDa + LAM istotnym czynnikiem była jedynie rozległość radiologiczna zmian: zajęcie 1 pola płucnego – 340,19 U/ml, 2 pól płucnych – 864,21 U/ml, powyżej 3 pól – 798,12 U/ml. Różnica pomiędzy grupą z zajęciem 1 polem a grupą



Ryc. 11. Średnie wartości IgG anti-38 + 16-kDa (wraz z odchyleniami standardowymi) w zależności od wybranych czynników.



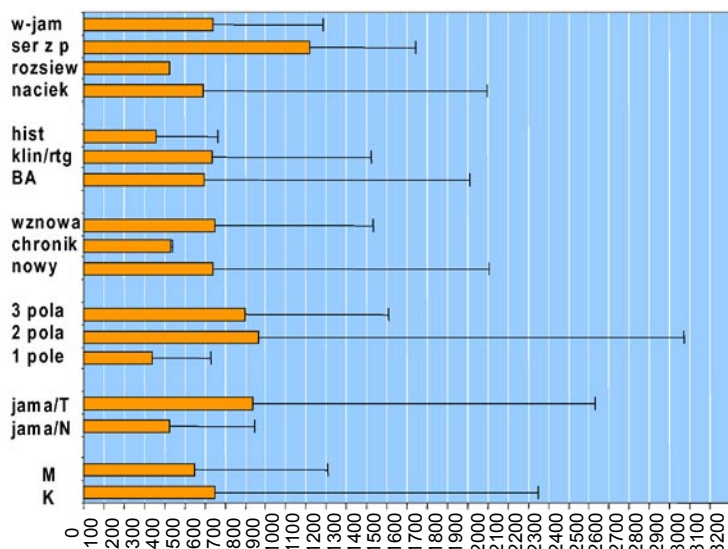
Ryc. 12. Średnie miano IgG anti-38-kDa + LAM (wraz z odchyleniami standardowymi) w zależności od wybranych czynników.

chorych, u których zajęte były powyżej 3 pola była istotna ($p=0,02$) (rycina 13).

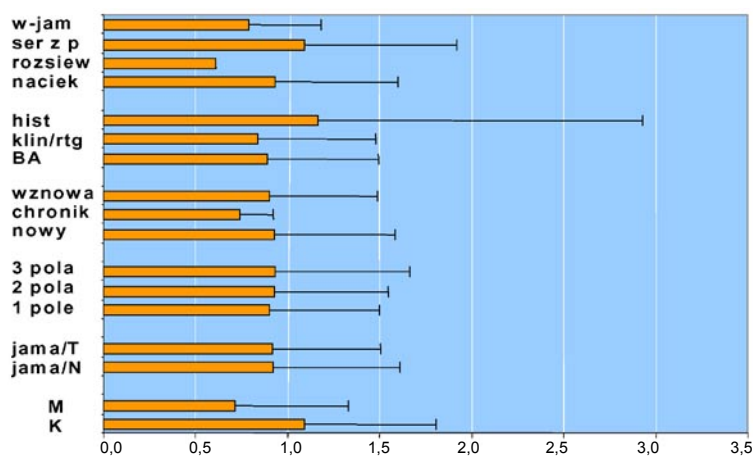
Żaden z czynników związanych z przebiegiem choroby nie wpływał w sposób istotny na miano przeciwciał IgM anti-38-kDa + LAM. Jedynym czynnikiem statystycznie istotnym była płeć. Średni indeks u mężczyzn wynosił 0,72 a u kobiet 1,09 ($p=0,02$) (rycina 14).

Na produkcję przeciwciał IgG antiA60 istotnie wpływały następujące czynniki: płeć, przebieg kliniczny, postać choroby oraz rozległość radiologiczna. Średnie miano przeciwciał u mężczyzn

wynosiło 653,72 U/ml, a u kobiet – 160,44 U/ml ($p<0,0001$). U chorych ze świeżo rozpoznaną chorobą średnie miano wynosiło 388,46 U/ml, u chorych ze świeżo rozpoznaną chorobą – 388,46 U/ml, u chorych ze wznową – 593,09 U/ml. Różnica pomiędzy grupą chorych ze wznową a grupą nowych przypadków jest statystycznie istotna ($p<0,01$). W gruźlicy naciekowej średnie miano wyniosło 346,75 U/ml, w postaci rozsianej – 773,35 U/ml, w serowatym zapaleniu płuc 163,4 U/ml, w postaci włóknisto-jamistej 804,79 U/ml. Różnica była statystycznie istotna pomiędzy gruźlicą naciekową, a rozsianą i włóknisto-jamistą



Ryc. 13. Średnie miana IgA anti-38-kDa + LAM (wraz z odchyleniami standardowymi) w zależności od wybranych czynników.



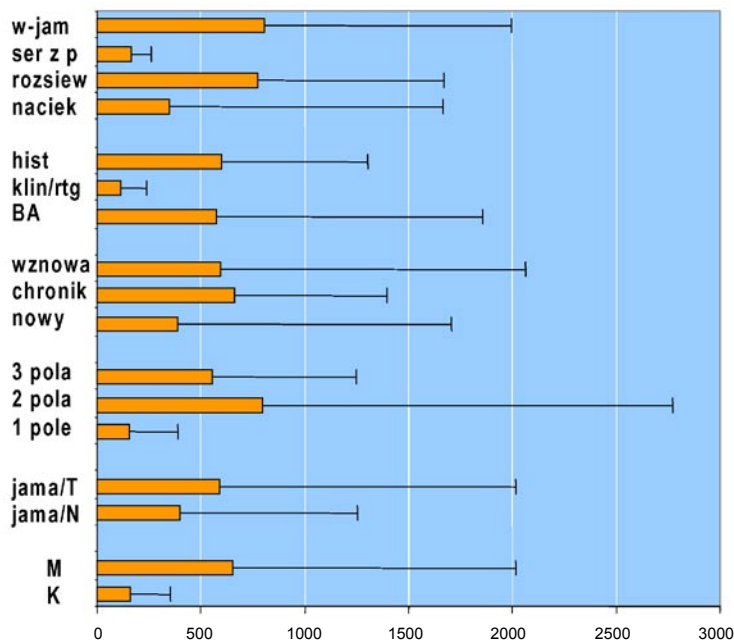
Ryc. 14. Średnie wartości indeksów IgM anti-38-kDa + LAM (wraz z odchyleniami standardowymi) w zależności od wybranych czynników.

($p < 0,0001$). Przy zajęciu 1 pola płucnego średnie miano wynosiło 153,78 U/ml, dla 2 pól płucnych – 793,87 U/ml, powyżej 3 pól – 553,13 U/ml. Różnica pomiędzy grupą z zajęciem 1 polem a grupą chorych, u których zajęte były dwa pola oraz grupą, u której zajęte były powyżej 3 pola była istotna ($p < 0,0001$) (rycina 15).

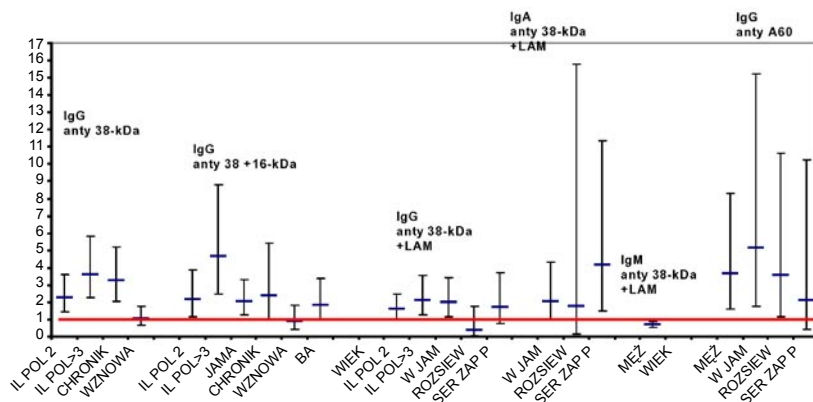
Na podstawie wielowymiarowej analizy regresji porównano siłę oddziaływania poszczególnych czynników na odpowiedź humoralną. Wyniki prezentowane są w postaci ryzyka względnego, wyniki większe od 1 świadczą o tym, że osoby z wyróżnioną kategorią mają średnio wyższe wyniki niż osoby z kategorii referencyjnej i podobnie wyniki mniejsze od 1 świadczą o średnio niższych wynikach w stosunku do kategorii referencyjnej (rycina 16).

Wykazano istotne znaczenie niektórych zmiennych determinujących nasilenie odpowiedzi humoralnej. Radiologiczna rozległość zmian koreluje istotnie z poziomem przeciwciał klasy IgG przeciwko 38-kDa (2,29 – 2 pola płucne, 3,62 – ponad

3 pola płucne $p < 0,001$), IgG anti 38 + 16-kDa (2,15 – 2 pola płucne, 4,66 – ponad 3 pola płucne $p < 0,01$ i $p < 0,001$) oraz IgG anti 38-kDa + LAM (1,6-2 pola płucne, 4,66 – ponad 3 pola płucne $p = 0,04$ i $p < 0,01$). Kategorią referencyjną jest zajęcie 1 pola płucnego. Przebieg kliniczny ma istotne znaczenie w przypadku produkcji przeciwciał IgG anti 38-kDa (kategoria chronik 3,24 $p < 0,001$) oraz anti 38 + 16-kDa (kategoria chronik 2,36, $p < 0,05$). Kategorią referencyjną były nowe przypadki. Obecność prątkowania była istotnym czynnikiem determinującym poziom przeciwciał jedynie w przypadku IgG anti 38-kDa (1,84, $p < 0,05$). Wynik porównywano do rozpoznań kliniczno/radiologicznych oraz do rozpoznań na podstawie histologii. Postać gruźlicy wpływała na odpowiedź w klasie IgG anti A60 (kategoria włóknisto-jamista 5,16 $p < 0,0001$ i kategoria rozsiew 3,56 $p < 0,02$) i IgG anti 38-kDa + LAM (włóknisto-jamista 1,98 $p < 0,02$) i IgA anti 38-kDa + LAM (serowate zapalenie płuc 4,13 $p < 0,01$). Kategorią referencyjną był gruźlica naciekowa. Płeć męska była



Ryc. 15. Średnie miana przeciwciał IgG anti-A60 (wraz z odchyleniami standardowymi) w zależności od wybranych czynników.



Ryc. 16. Czynniki wpływające na poziom przeciwciał – wyniki analizy regresji po eliminacji zmiennych nieistotnych statystycznie.

czynnikiem ryzyka wyższego poziomu IgG anti A60 (3,67 $p < 0,001$) oraz obniżonego poziomu IgM (0,71 $p < 0,01$). Wiek był czynnikiem wpływającym na poziom przeciwciał IgG anti 38-kDa + LAM (0,98 $p < 0,001$) i IgM anti 38-kDa + LAM (0,99 $p = 0,04$). W obu przypadkach korelacja była ujemna. Rycina 16 przedstawia graficznie wyniki analizy wielowymiarowej zmiennych istotnych. Wyniki prezentowane są w postaci ryzyka względnego. Dolna i górna granica każdej zmiennej determinuje przedział ufności. Znamienność statystyczną determinuje przedział ufności niezawierający wartości 1. Dla porównania na wykresie uwzględniono również kilka zmiennych nieistotnych.

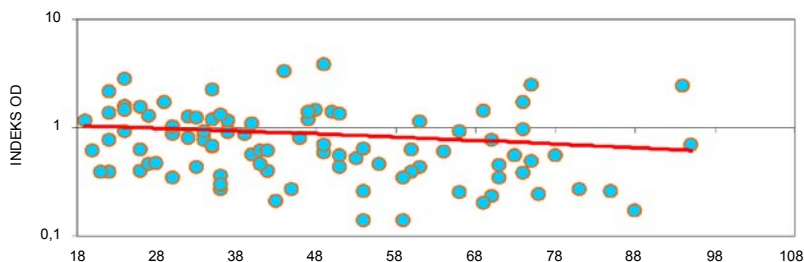
Ponieważ wiek był jedyną zmienną ciągłą wyniki istotnych korelacji miano/wiek przedstawiono w postaci wykresów z linią trendu (rycina 17 i rycina 18).

Poziomy przeciwciał u poszczególnych chorych skorelowano z wynikiem odczynu tuberkulinowego. W przypadku wszystkich testów, za wyjątkiem

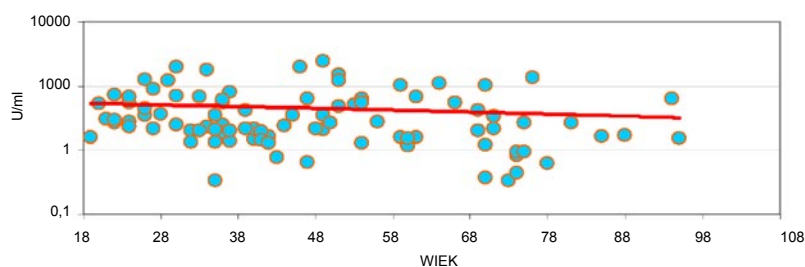
testu IgM, obserwowano ujemną korelację pomiędzy wysokością miana przeciwciał a wielkością odczynu tuberkulinowego w milimetrach. Dla testu IgG anti 38-kDa oraz testu IgA korelacje te były znamienne statystycznie ($p = 0,04$ i $p = 0,02$ odpowiednio) (rycina 19 i rycina 20).

3. Gruźlica pozapłucna

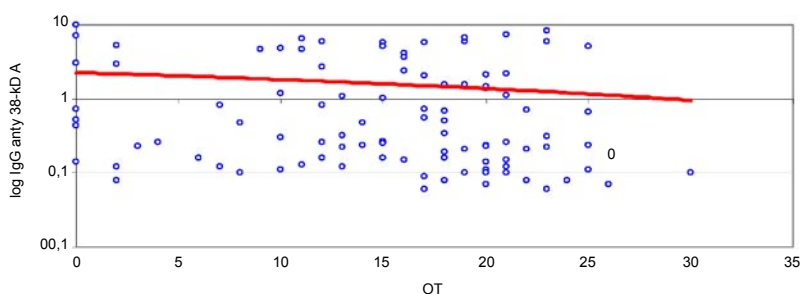
W grupie chorych na gruźlicę pozapłucną wykonano oznaczenia poziomu przeciwciał klasy IgG przeciwko antygenowi A60, 38kDa oraz 38kDa+16kDa oraz IgG, IgA i IgM przeciwko 38kDa + LAM. Wyniki porównano z grupą chorych na gruźlicę płuc oraz grupami kontrolnymi. Oceniono poziomy przeciwciał w grupie wszystkich chorych na gruźlicę pozapłucną łącznie oraz w najliczniejszych podgrupach: gruźlicy kości i stawów, gruźlicy układu moczowego, gruźlicy węzłów chłonnych oraz płucnej.



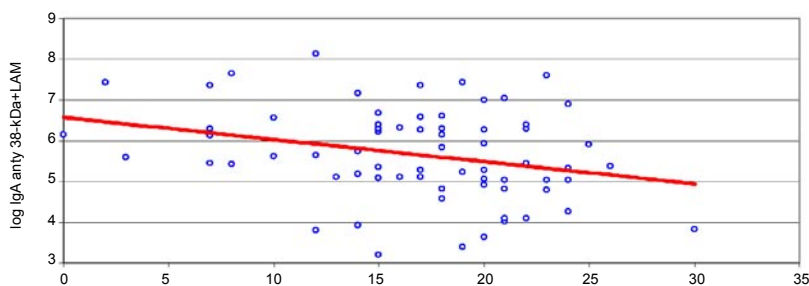
Ryc. 17. Zależność indeksu gęstości optycznej IgM od wieku w grupie dorosłych chorych na gruźlicę.



Ryc. 18. Zależność poziomu przeciwciał IgG anti 38-kDa + LAM od wieku w grupie dorosłych chorych na gruźlicę.



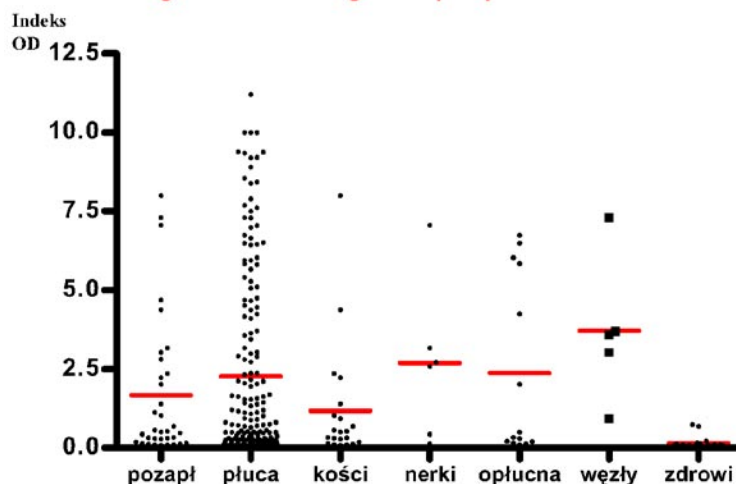
Ryc. 19. Korelacja pomiędzy wynikiem odczynu tuberkulinowego a poziomem przeciwciał IgG anti 38-kDa.



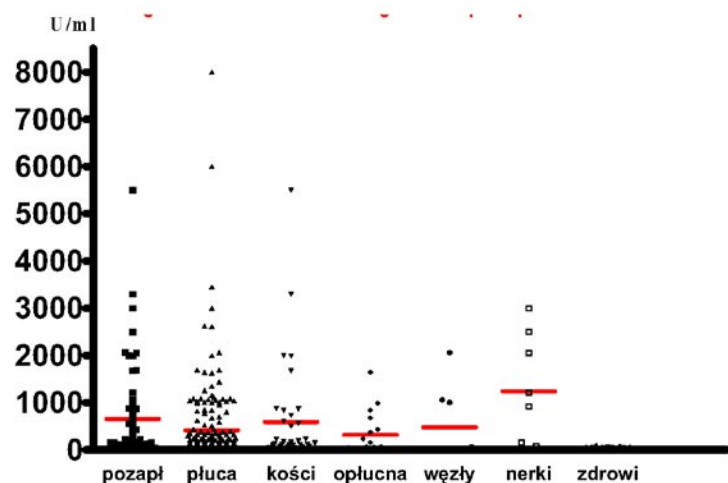
Ryc. 20. Korelacja pomiędzy wynikiem odczynu tuberkulinowego a poziomem przeciwciał IgA anti 38-kDa.

Średni indeks gęstości optycznej IgG anti 38-kDa w gruźlicy pozapłucnej wynosił $1,67 \pm 0,38$ i był niższy niż w przypadku gruźlicy płuc – $2,26 \pm 0,21$ ($p < 0,05$). Różnica pomiędzy gruźlicą pozapłucną a grupą kontrolną była wysoce istotna ($p < 0,0001$). Poziomy przeciwciał we wszystkich podgrupach gruźlicy pozapłucnej były wysoce znacząco wyższe od kontroli ($p < 0,0001$) i nie różniły się istotnie między sobą (rycina 21).

W przypadku klasy IgG anti 38 + 16-kDa obserwowana różnica pomiędzy gruźlicą płuc (397 ± 47 U/ml) a pozapłucną (655 ± 103 U/ml) była nieznamienista, natomiast gruźlica pozapłucna i wszystkie podgrupy różniły się istotnie od grupy kontrolnej ($p < 0,001$). Najwyższe poziomy przeciwciał obserwowano w grupie chorych na gruźlicę nerek, jednak różnice pomiędzy żadnymi podgrupami nie były istotne statystycznie (rycina 22).



Ryc. 21. Poziom przeciwciał IgG anty 38-kDa w grupie dorosłych chorych na gruźlicę płuc, pozapłucną oraz w podgrupach gruźlicy pozapłucnej w porównaniu do grupy zdrowych. (pozapł – gruźlica pozapłucna, płuca – gruźlica płuc, kości – gruźlica kości i stawów, nerki – gruźlica nerek, opłucna – gruźlica opłucnej, węzły – gruźlica węzłów chłonnych obwodowych, zdrowi – grupa osób zdrowych)



Ryc. 22. Poziom przeciwciał IgG anty 38 + 16-kDa w grupie dorosłych chorych na gruźlicę płuc, pozapłucną oraz w podgrupach gruźlicy pozapłucnej w porównaniu do grupy zdrowych.

Porównując poziomy przeciwciał IgG anty38-kDa + LAM w gruźlicy płuc (296 ± 33 U/ml) i pozapłucnej ($493,8 \pm 74,4$ U/ml) wykazano różnicę znamioną statystycznie na poziomie istotności $p < 0,01$. Gruźlica pozapłucna i jej wszystkie podgrupy różniły się wysoce znamionie od grupy kontrolnej ($p < 0,0001$), natomiast nie różniły się istotnie pomiędzy sobą (rycina 23).

W przypadku IgA anty 38-kDa + LAM obserwowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy gruźlicą płuc 618 ± 111 U/ml, a pozapłucną – 266 ± 40 U/ml ($p < 0,01$). Różnica pomiędzy grupą gruźlicy pozapłucnej i jej wszystkimi podgrupami a grupą kontrolną była wysoce istotna ($p < 0,0001$). Podgrupy nie różniły się istotnie między sobą (rycina 24).

W przypadku klasy IgM średnie indeksy gęstości optycznej pomiędzy grupą gruźlicy płuc ($1,12 \pm 0,11$) a grupą gruźlicy pozapłucnej ($0,669 \pm 0,1$) różniły się istotnie ($p < 0,05$). Zarówno gruźlica pozapłucna jak i podgrupy, za wyjątkiem gruźlicy kości, różniły się od grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Różnica pomię-

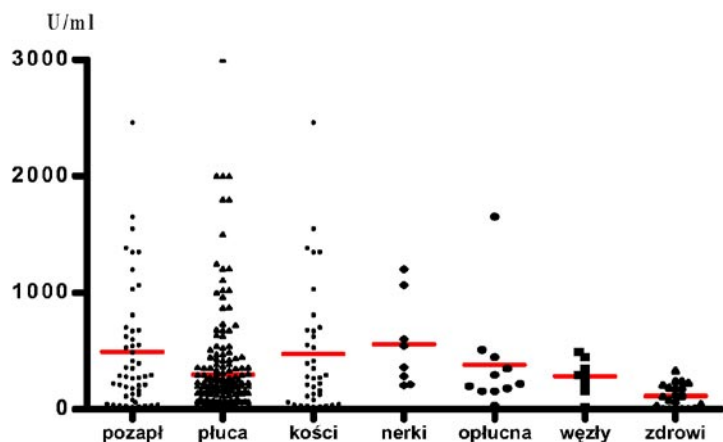
dzy gruźlicą kości a kontrolą była nieznamionna (rycina 25).

W klasie IgG anty A60 nie obserwowano statystycznej różnicy pomiędzy grupą gruźlicy płuc ($453,18 \pm 98$ U/ml) a grupą gruźlicy pozapłucnej ($356,8 \pm 75$ U/ml). Gruźlica pozapłucna oraz gruźlica nerek i kości różniły się od kontroli ($p < 0,0001$). Średnie poziomy przeciwciał w pozostałych podgrupach nie były statystycznie różne od kontroli (rycina 26).

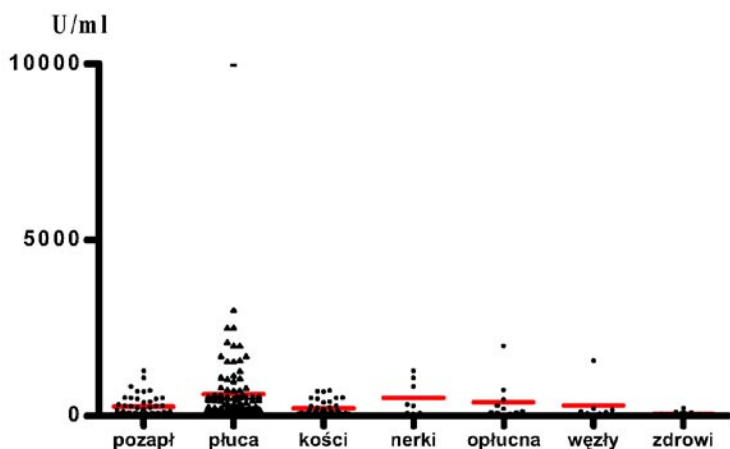
4. Gruźlica u dzieci

Średnie miana przeciwciał przeciwko badanym antygenom porównano w następujących grupach: dzieci chore na gruźlicę ograniczoną do węzłów chłonnych tchawiczo-oskrzelowych, dzieci chore na gruźlicę płuc, dzieci zakażone prątkiem oraz w grupie kontrolnej (dzieci zdrowe oraz chore na inne niż gruźlica choroby układu oddechowego).

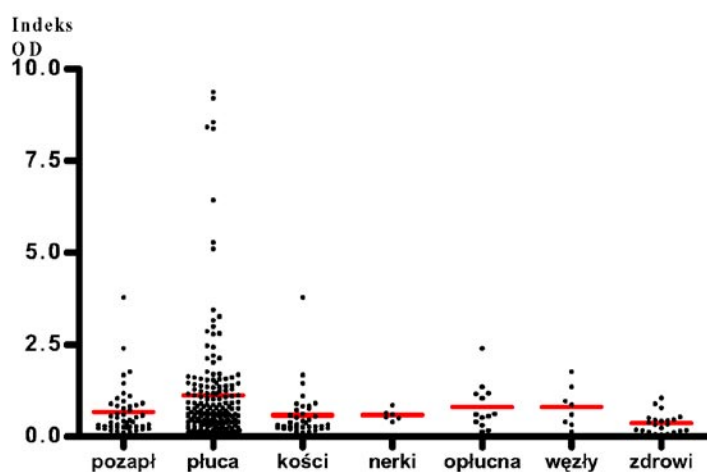
W klasie IgG anty 38-kDa średnie indeksy gęstości optycznej wynosiły w gruźlicy płuc $1,76 \pm 0,65$,



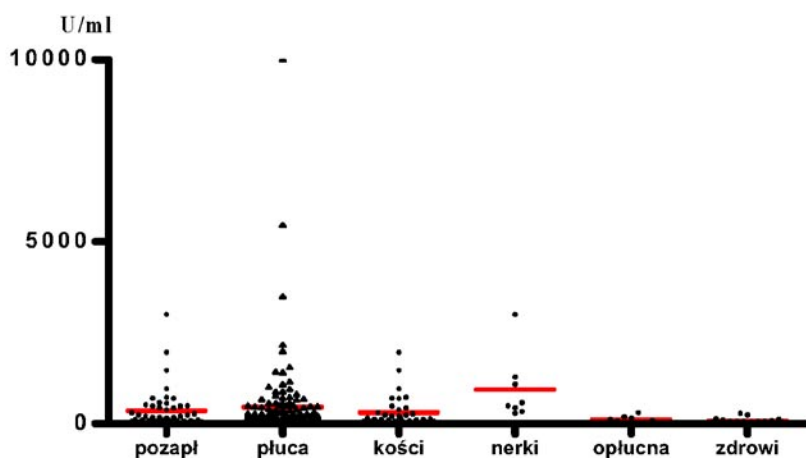
Ryc. 23. Poziom przeciwciał IgG anty 38 + LAM w grupie dorosłych chorych na gruźlicę płuc, pozapłucną oraz w podgrupach gruźlicy pozapłucnej w porównaniu do grupy zdrowych.



Ryc. 24. Poziom przeciwciał IgA anty 38 + LAM w grupie dorosłych chorych na gruźlicę płuc, pozapłucną oraz w podgrupach gruźlicy pozapłucnej w porównaniu do grupy zdrowych.



Ryc. 25. Poziom przeciwciał IgM anty 38 + LAM w grupie dorosłych chorych na gruźlicę płuc, pozapłucną oraz w podgrupach gruźlicy pozapłucnej w porównaniu do grupy zdrowych.



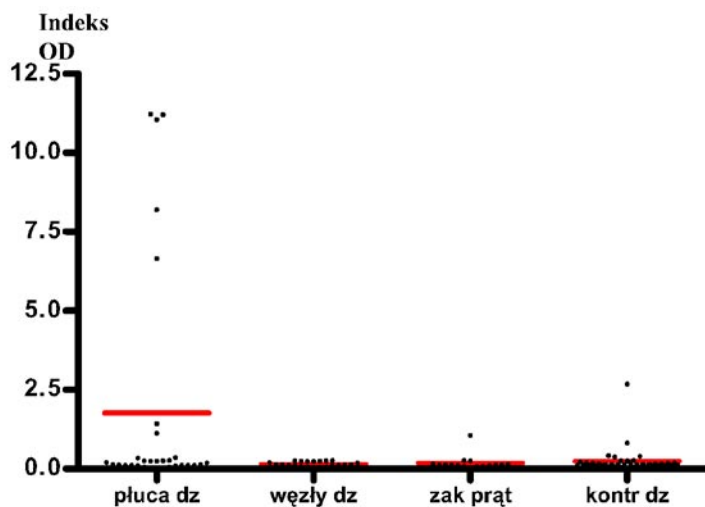
Ryc. 26. Poziom przeciwciał IgG anty A60 w grupie dorosłych chorych na gruźlicę płuc, pozapłucną oraz w podgrupach gruźlicy pozapłucnej w porównaniu do grupy zdrowych.

w gruźlicy węzłowej $0,15 \pm 0,016$, w grupie zakażonych prątkiem $0,18 \pm 0,06$ a w grupie kontrolnej $0,23 \pm 0,06$. Różnica pomiędzy grupą kontrolną a grupą chorych na gruźlicę płuc była istotna ($p < 0,01$). Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy pozostałymi podgrupami (rycina 27).

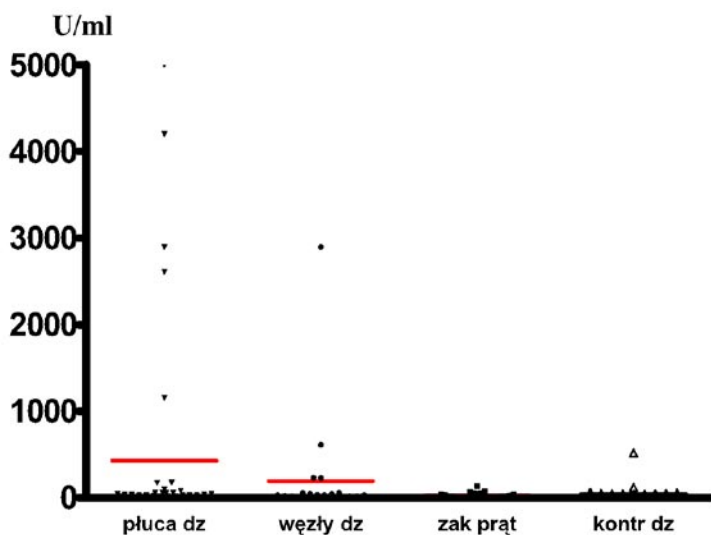
Porównując poziomy przeciwciał w grupie gruźlicy płuc wynosił 430 ± 182 U/ml a grupie kontrolnej $30,42 \pm 7,5$ U/ml. Różnica pomiędzy oboma grupami była istotna ($p < 0,01$). Poziom przeciwciał w gruźlicy węzłowej wynosił $192,4 \pm 125$ U/ml. Różnica pomiędzy gruźlicą węzłową a kontrolą była znamienne (p<0,05). Poziom przeciwciał w grupie dzieci zakażonych prątkiem wynosił $30 \pm 5,7$ U/ml. Różnica pomiędzy grupą dzieci zakażonych prątkiem a kontrolą była nieistotna (rycina 28).

Średni poziom przeciwciał klasy IgG anty 38-kDa + LAM w grupie dzieci chorych na gruźlicę płuc wynosił $310,5 \pm 114,8$ U/ml, w grupie gruźlicy węzłowej $51,05 \pm 11,4$ U/ml, w grupie kontrolnej $89,9 \pm 12,3$ U/ml, w grupie dzieci zakażonych prątkiem $142,5 \pm 48,09$ U/ml. Średni poziom przeciwciał w grupie dzieci z gruźlicą płuc był wyższy niż w grupie kontrolnej, ale różnica była nieistotna. Nie obserwowano również statystycznej istotności pomiędzy pozostałymi grupami (rycina 29).

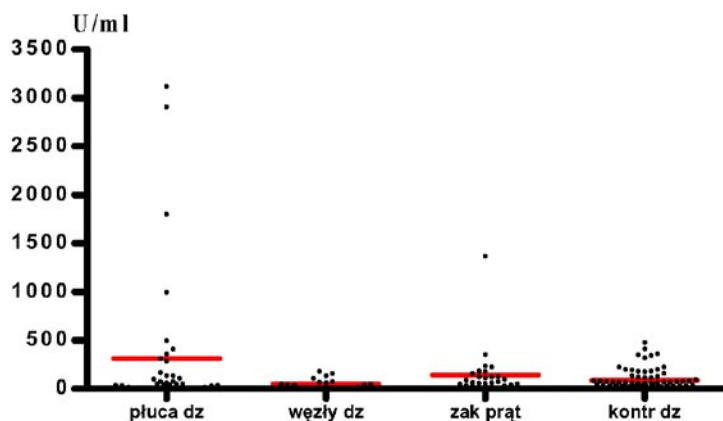
Średni poziom przeciwciał klasy IgA w gruźlicy płuc wynosił 114 ± 76 U/ml, w gruźlicy węzłowej 58 ± 11 U/ml, w grupie dzieci zakażonych prątkiem 130 ± 44 U/ml i w grupie kontrolnej 112 ± 14 U/ml. Pomiędzy grupą gruźlicy płuc a grupą kontrolną różnica była znamienne statystycznie ($p < 0,05$), podobnie pomiędzy grupą gruźlicy węzłowej a gru-



Ryc. 27. Poziom przeciwciał IgG anty 38-kDa w grupie dzieci chorych na gruźlicę płuc, gruźlicę węzłów chłonnych tchawiczo-oskrzelowych oraz zakażonych prątkiem w porównaniu do grupy kontrolnej. (płuca dz – gruźlica płuc u dzieci, węzły dz – gruźlica węzłów tchawiczo – oskrzelowych u dzieci, zak prąt – grupa zakażonych prątkiem, kontr dz – grupa kontrolna dzieci)



Ryc. 28. Poziom przeciwciał IgG anty 38 + 16-kDa w grupie dzieci chorych na gruźlicę płuc, gruźlicę węzłów chłonnych tchawiczo-oskrzelowych oraz zakażonych prątkiem w porównaniu do grupy kontrolnej.



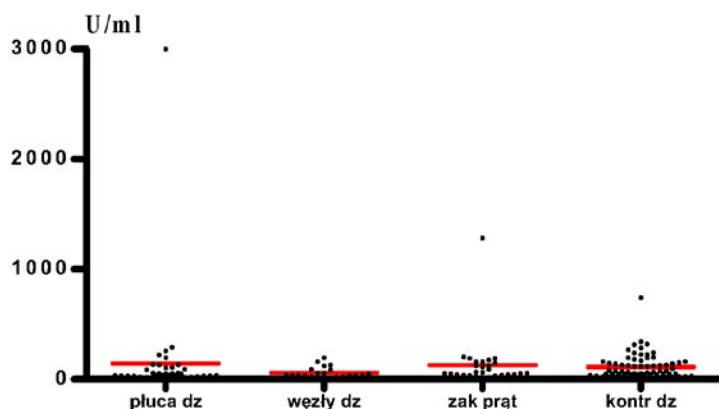
Ryc. 29. Poziom przeciwciał IgG anty 38 + LAM w grupie dzieci chorych na gruźlicę płuc, gruźlicę węzłów chłonnych tchawiczo-oskrzelowych oraz zakażonych prątkiem w porównaniu do grupy kontrolnej.

pą kontrolną ($p < 0,01$) oraz pomiędzy grupą dzieci zakażonych prątkiem a grupą chorych na gruźlicę płuc ($p < 0,05$). Pozostałe różnice były nieistotne (rycina 30).

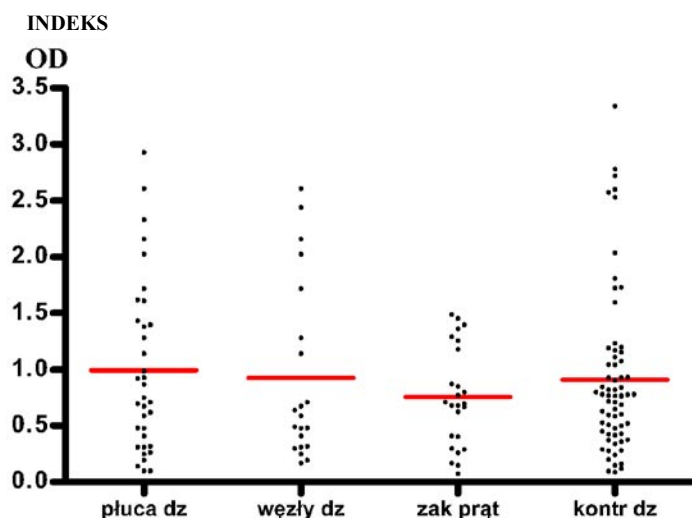
Średni indeks gęstości optycznej dla klasy IgM w grupie gruźlicy płuc wynosił $0,99 \pm 0,12$, dla grupy gruźlicy węzłowej $0,92 \pm 0,17$, dla grupy zakażonych prątkiem $0,75 \pm 0,08$ oraz dla grupy kontrolnej $0,9 \pm 0,08$. Wszystkie różnice były nieistotne statystycznie (rycina 31).

Średnie miana przeciwciał klasy IgG anty A60 wynosiły: w grupie gruźlicy płuc $143,11 \pm 68$ U/ml, dla gruźlicy węzłów $24,22 \pm 8,5$ U/ml, dla grupy zakażonych prątkiem $21 \pm 7,7$ U/ml, w grupie kontrolnej $34 \pm 5,2$ U/ml. Różnice pomiędzy grupami były nieistotne statystycznie (rycina 32).

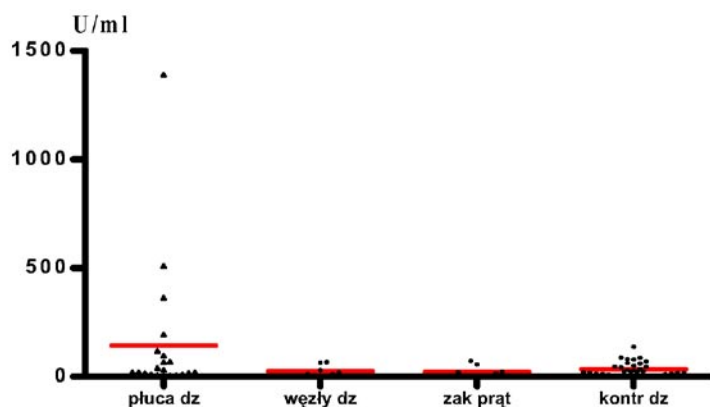
Przeciwnie niż u dorosłych, w grupie dzieci nie obserwowano znamiennej korelacji pomiędzy wynikiem odczynu tuberkulinowego a poziomem przeciwciał żadnej z badanych klas.



Ryc. 30. Poziom przeciwciał IgA anty 38 + LAM w grupie dzieci chorych na gruźlicę płuc, gruźlicę węzłów chłonnych tchawiczo-oskrzelowych oraz zakażonych prątkiem w porównaniu do grupy kontrolnej.



Ryc. 31. Poziom przeciwciał IgM anty 38 + LAM w grupie dzieci chorych na gruźlicę płuc, gruźlicę węzłów chłonnych tchawiczo-oskrzelowych oraz zakażonych prątkiem w porównaniu do grupy kontrolnej.



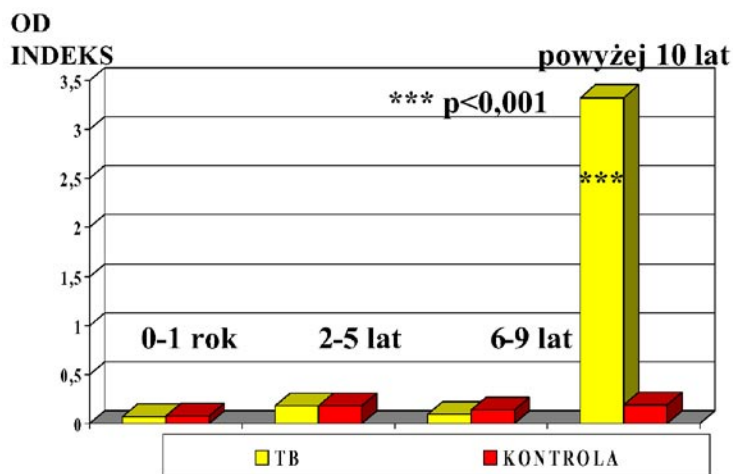
Ryc. 32. Poziom przeciwciał IgG anti A60 w grupie dzieci chorych na gruźlicę płuc, gruźlicę węzłów chłonnych tchawiczo-oskrzelowych oraz zakażonych prątkiem w porównaniu do grupy kontrolnej.

Celem oceny dynamiki produkcji przeciwciał w zależności od wieku, średnie poziomy przeciwciał chorych grupie dzieci chorych na gruźlicę porównano do grupy kontrolnej w następujących przedziałach wiekowych: 0-1 lat, 2-5 lat, 6-9 lat oraz 10-18 lat.

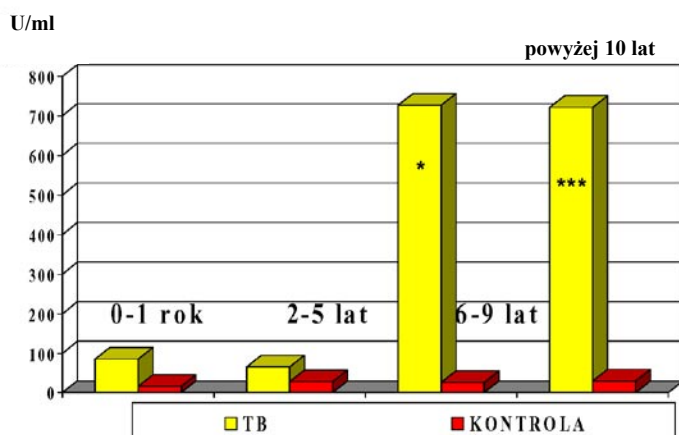
Dla klasy IgG anti 38-kDa średnie indeksu OD dla poszczególnych podgrup były następujące: gruźlica poniżej 2 roku życia $0,06 \pm 0,008$; kontrola $0,11 \pm 0,02$; 2-5 lat – gruźlica $0,14 \pm 0,02$ kontrola $0,2 \pm 0,04$; 6-9 lat – gruźlica $0,14 \pm 0,02$, kontrola $0,14 \pm 0,01$; 10-18 lat – gruźlica $2,9 \pm 1,04$ kontrola $0,27 \pm 0,1$. Różnica między grupą gruźlicy a kontrolą była istotna statystycznie tylko w przypadku najstarszej podgrupy ($p < 0,0001$) (ryc. 33).

Średnie miana przeciwciał IgG anti 38 + 16-kDa w grupie poniżej 2 roku życia wynosiły: gruźlica: 86 ± 50 U/ml, kontrola: 17 ± 4 U/ml. W grupie 2-5 lat – gruźlica: $66,2 \pm 33$ U/ml, kontrola: $28 \pm 7,8$ U/ml; 6-9 lat gruźlica: 726 ± 553 U/ml, kontrola: $26,8 \pm 4$ U/ml ($p < 0,05$), 10-18 lat gruźlica: 721 ± 327 U/ml, kontrola: $30,35 \pm 5$ U/ml ($p < 0,0001$). Różnica pomiędzy grupami dzieci chorych na gruźlicę poniżej 5 roku życia a grupami starszymi była istotna ($p < 0,05$) (ryc. 34).

Średnie miana przeciwciał IgG anti 38 + LAM były następujące: grupa poniżej 2 roku życia gruźlica: 92 ± 45 U/ml, kontrola: 71 ± 20 U/ml. Dzieci w wieku 2-5 lat: gruźlica: $52,4 \pm 14$ U/ml, kontrola: $59,1 \pm 14$ U/ml; grupa 6-9 lat – gruźlica: $295,7 \pm 182$



Ryc. 33. Średni poziom przeciwciał IgG anti 38-kDa w grupie dzieci chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy kontrolnej w różnych przedziałach wiekowych.



Ryc. 34. Średni poziom przeciwciał IgG anti 38 + 16-kDa w grupie dzieci chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy kontrolnej w różnych przedziałach wiekowych.

U/ml, kontrola: $62, \pm 13,8$ U/ml ($p < 0,05$), 10-18 lat – gruźlica: 460 ± 194 U/ml kontrola: $147,8 \pm 32,13$ U/ml ($p < 0,0001$) (rycina 35).

Średnie miana przeciwciał IgA anty 38 + LAM były następujące: grupa poniżej 2 roku życia – gruźlica: $80,8 \pm 21$ U/ml, kontrola: $106,7 \pm 29,3$ U/ml. Dzieci w wieku 2-5 lat – gruźlica: $36,6 \pm 7$ U/ml, kontrola: $28 \pm 17,96$ U/ml; 6-9 lat – gruźlica: $68,31 \pm 21$ U/ml, kontrola: $81,2 \pm 18,52$ U/ml ($p < 0,05$), 10-18 lat – $231,6 \pm 133$ U/ml kontrola $156,2 \pm 530$ U/ml. Różnica pomiędzy grupami dzieci chorych na gruźlicę poniżej 5 roku życia a grupą chorych powyżej 10 roku życia jest istotna ($p < 0,001$) (rycina 36).

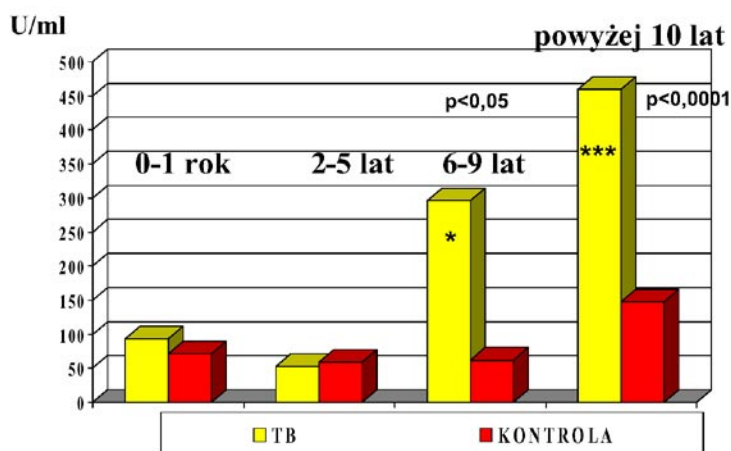
W klasie IgM anty 38-kDa + LAM średnie indeksu OD dla poszczególnych podgrup były następujące: poniżej 2 roku życia – gruźlica: $0,38 \pm 0,12$; kontrola: $0,7 \pm 0,17$, grupa 2-5 lat – gruźlica: $0,89 \pm 0,02$; kontrola: $0,7 \pm 0,017$; 6-9 lat – gruźlica: $0,87 \pm 0,34$; kontrola: $0,83 \pm 0,13$; 10-18 lat – gruźlica: $0,58 \pm 0,12$; kontrola: $0,94 \pm 11$. Różnice pomiędzy grupą gruźlicy a grupą kontrolną były nieistotne statystycznie we wszystkich podgrupach wiekowych (rycina 37).

Średnie miana przeciwciał IgG anty A60 były następujące: grupa poniżej 2 roku życia – gruźlica:

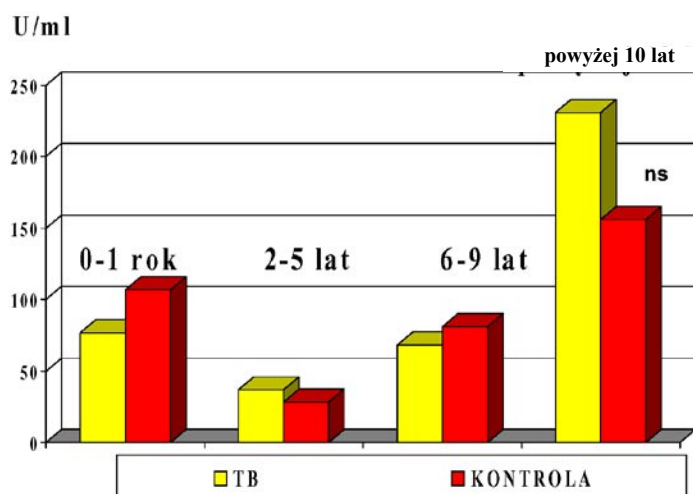
22 ± 7 U/ml, kontrola: $43,7 \pm 17$ U/ml. Grupa 2-5 lat – gruźlica: $28,5 \pm 12$ U/ml, kontrola: $26,3 \pm 8$ U/ml; dzieci w wieku 6-9 lat – poziom przeciwciał był zbadany jedynie w grupie kontrolnej – $22, \pm 3$ U/ml; 10-18 lat – gruźlica: 119 ± 47 U/ml kontrola: $31,78 \pm 4,3$ U/ml ($p < 0,05$) (rycina 38).

W przypadku wszystkich badanych przeciwciał obserwowano istotną dodatnią (przeciwnie niż u osób dorosłych) korelację pomiędzy wysokością miana przeciwciał a wiekiem dzieci. Dla IgG anty 38-kDa współczynnik korelacji $r = 0,57$, $p < 0,0001$, IgG anty 38 + 16-kDa $r = 0,39$ $p < 0,001$, IgG anty 38kDa + LAM $r = 0,34$ $p < 0,05$, IgA $r = 0,29$, $p < 0,05$, IgM $r = 0,47$ $p < 0,0001$; IgG anty A60 $r = 0,44$ $p < 0,05$. Najwyższe współczynniki korelacji obserwowano dla testu IgG anty 38-kDa oraz IgM anty 38-kDa + LAM (rycina 39, 40, 41).

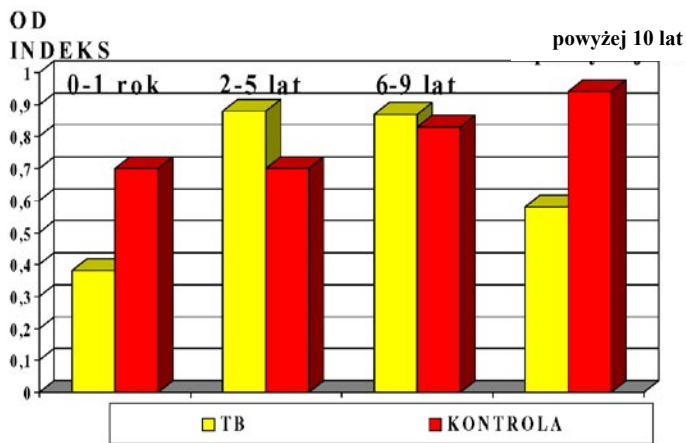
Analogicznie do grupy dorosłych, w grupie dzieci przeprowadzono analizę jednowymiarową polegającą na ocenie wpływu czynników osobniczych oraz związanych z przebiegiem choroby na odpowiedź humoralną. Dzieci podzielono na 3 grupy: gruźlicę węzłową, gruźlicę pierwotną węzłowo-płucną oraz gruźlicę popierwotną (gruźlica typu



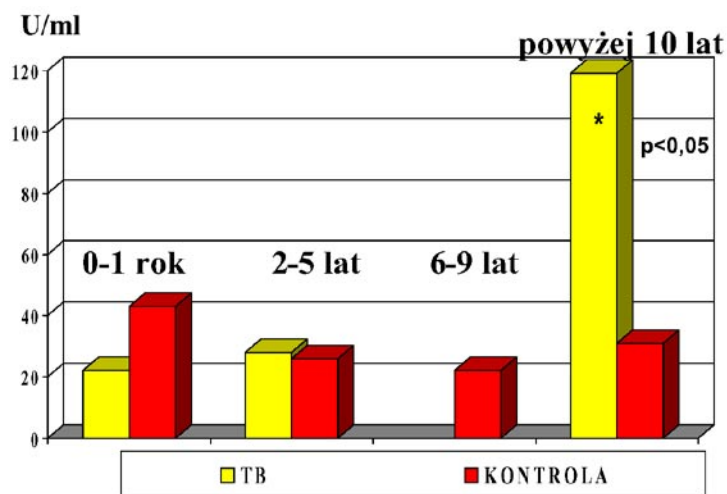
Ryc. 35. Średni poziom przeciwciał IgG anty 38 + LAM w grupie dzieci chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy kontrolnej w różnych przedziałach wiekowych.



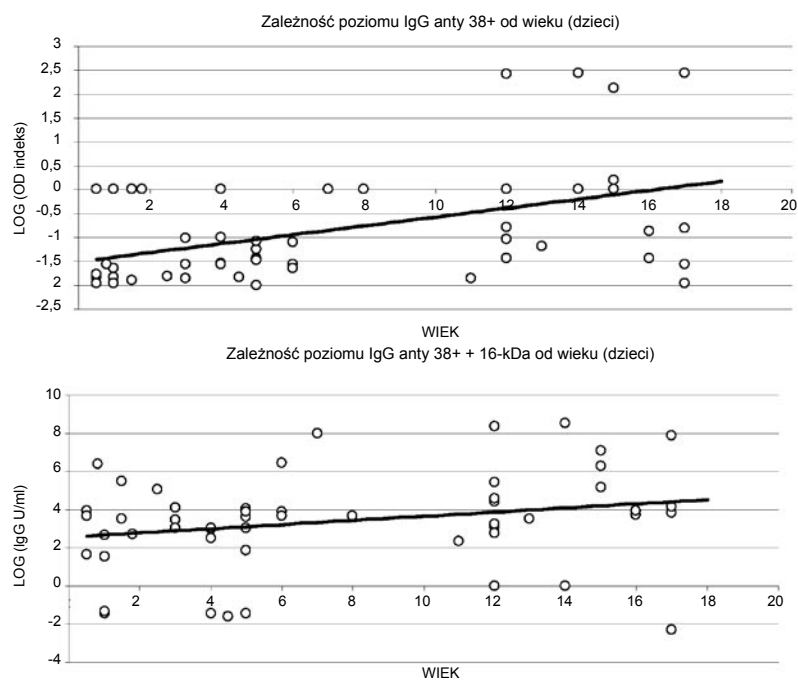
Ryc. 36. Średni poziom przeciwciał IgA anty 38-kDa + LAM w grupie dzieci chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy kontrolnej w różnych przedziałach wiekowych.



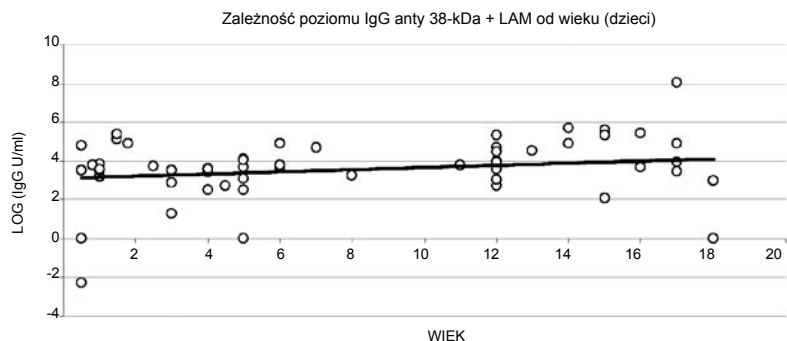
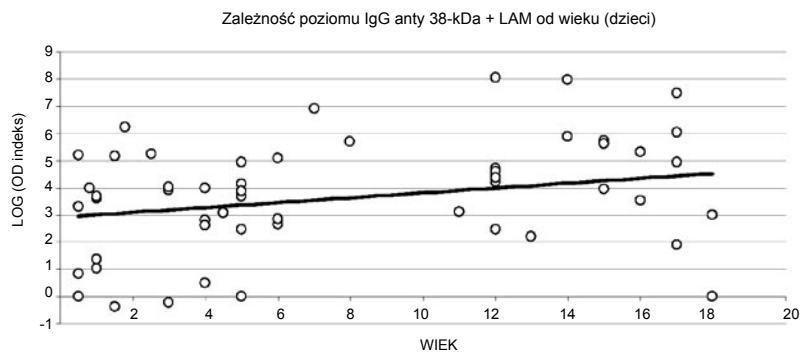
Ryc. 37. Średni poziom przeciwciał IgM anty 38-kDa + LAM w grupie dzieci chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy kontrolnej w różnych przedziałach wiekowych.



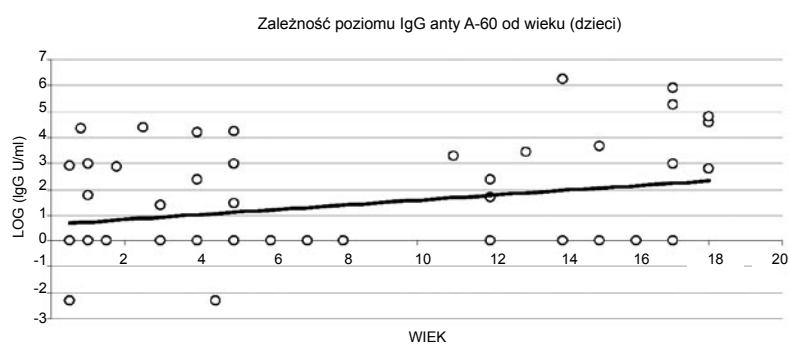
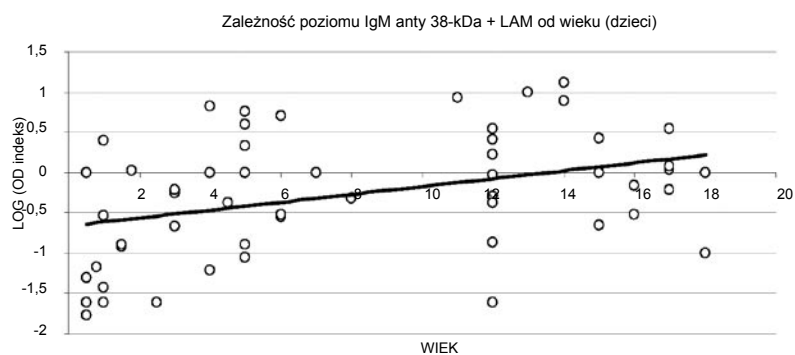
Ryc. 38. Średni poziom przeciwciał IgG anty A60 w grupie dzieci chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy kontrolnej w różnych przedziałach wiekowych.



Ryc. 39. Zależność pomiędzy poziomem IgG anty 38-kDa (38 + 16-kDa) a wiekiem u dzieci chorych na gruźlicę.



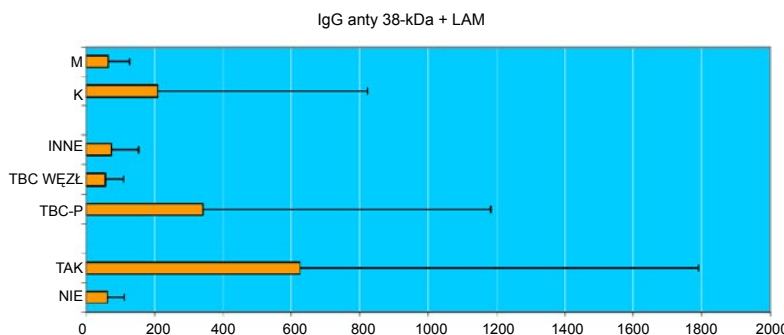
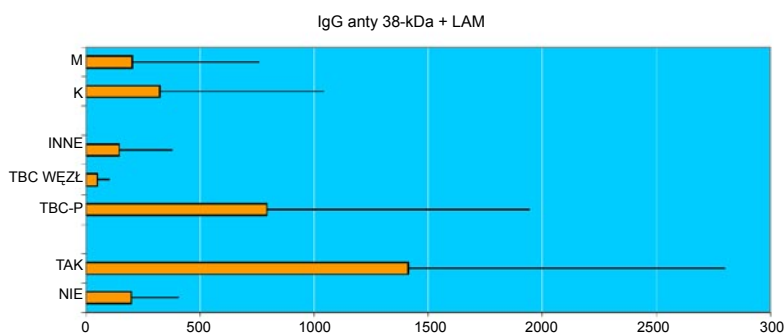
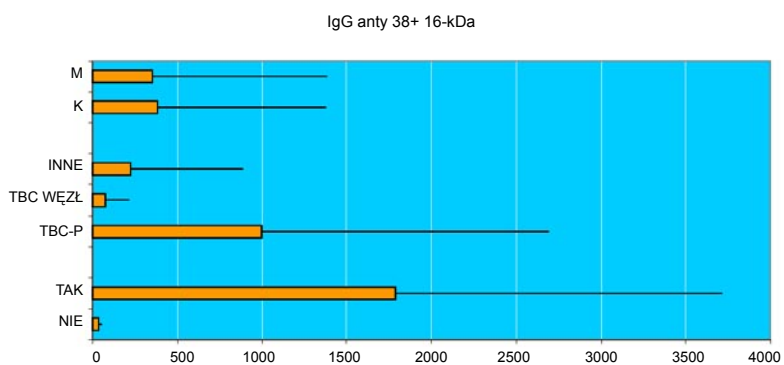
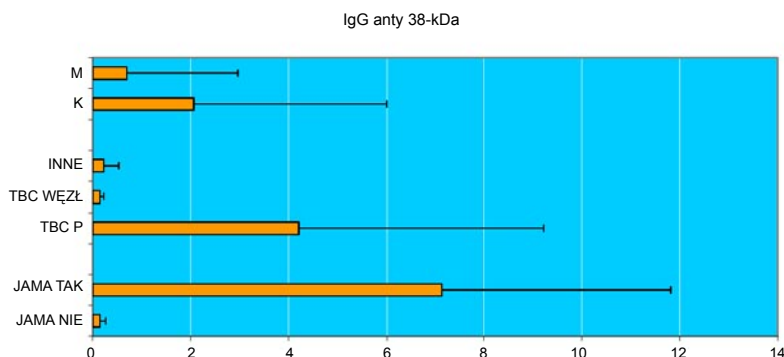
Ryc. 40. Zależność pomiędzy poziomem IgG i IgA anty 38 + LAM a wiekiem u dzieci chorych na gruźlicę.



Ryc. 41. Zależność pomiędzy poziomem IgM anty 38-kDa + LAM i IgG anty A60 a wiekiem u dzieci chorych na gruźlicę.

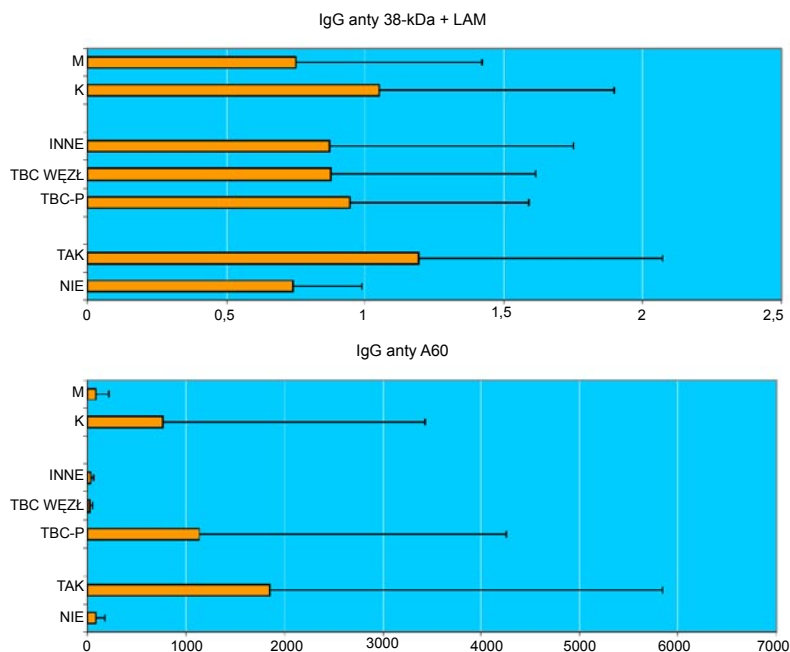
dorosłych). Średnie poziomy przeciwciał wszystkich testów opartych na klasie IgG były znacznie wyższe w gruźlicy popierwotnej w porównaniu do obu podgrup gruźlicy pierwotnej (anty 38-kDa $p<0,0001$; anty 38+ 16-kDa $p<0,05$; anty 38-kDa + LAM $p<0,01$). Dla przeciwciał klasy IgA i IgM nie obserwowano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy grupami dzieci z różną postacią choroby. Obecność jamy był czynnikiem wpływającym na poziom przeciwciał IgG anty 38-kDa oraz 38 + 16-

kDa ($p<0,001$) oraz IgA ($p<0,05$). W grupie dzieci chorych na gruźlicę, przeciwnie niż u dorosłych, poziomy wszystkich badanych przeciwciał były średnio wyższe u dziewczynek niż u chłopców. W żadnym jednak przypadku różnica nie była istotna statystycznie. Podobnie w grupie prątkujących poziom przeciwciał wszystkich klas był wyższy niż w grupie nieprątkujących, jednak różnice były nieznamiennie (rycina 42, 43, 44).



Ryc. 42. Średnie wartości indeksu IgG anty-38-kDa i anty 38 +16-kDa (wraz z odchyleniami standardowymi) w zależności od wybranych czynników. (M – chłopcy, K – dziewczynki, TBC węzł – gruźlica węzłów tchawiczooskrzelowych, TBC-P – gruźlica płuc, TAK – obecność jamy, NIE – brak jamy)

Ryc. 43. Średnie wartości indeksu IgG i IgA anty-38-kDa + LAM (wraz z odchyleniami standardowymi) w zależności od wybranych czynników.



Ryc. 44. Średnie wraz z odchyleniami standardowymi wartości indeksu IgM anty-38-kDa + LAM i IgG anty A60 w zależności od wybranych czynników.

Ze względu na odrębności w przebiegu gruźlicy w grupie dzieci młodszych i starszych dokonano oceny czynników modyfikujących odpowiedź humoralną w 2 podgrupach wiekowych: poniżej i powyżej 10 roku życia. W obu podgrupach dokonano analizy wieloczynnikowej uwzględniającej postać kliniczną choroby, płeć oraz obecność prątkowania. U dzieci poniżej 10 roku życia nie obserwowano gruźlicy popierwotnej. Nie było istotnych różnic pomiędzy grupami dzieci z rozpoznaniem gruźlicy węzłowej i węzłowo-płucnej w żadnej z podgrup wiekowych. Obecność prątkowania wpływała na wysokość miana przeciwciał jedynie dla IgG anty A60 w grupie dzieci poniżej 10 roku życia ($p < 0,001$) i w grupie dzieci starszych ($p < 0,05$). Obecność jamy (bądź rozpadu) była czynnikiem korelującym z bardziej nasiloną odpowiedzią humoralną w grupie dzieci młodszych jedynie w przypadku klasy IgG anty 38-kDa + LAM ($p < 0,05$) natomiast w grupie starszej dla wszystkich przeciwciał klasy IgG ($p < 0,05$). Nie obserwowano wpływu płci na produkcję przeciwciał w żadnej z analizowanych podgrup.

Wartość diagnostyczna testów serologicznych w rozpoznawaniu różnych postaci gruźlicy.

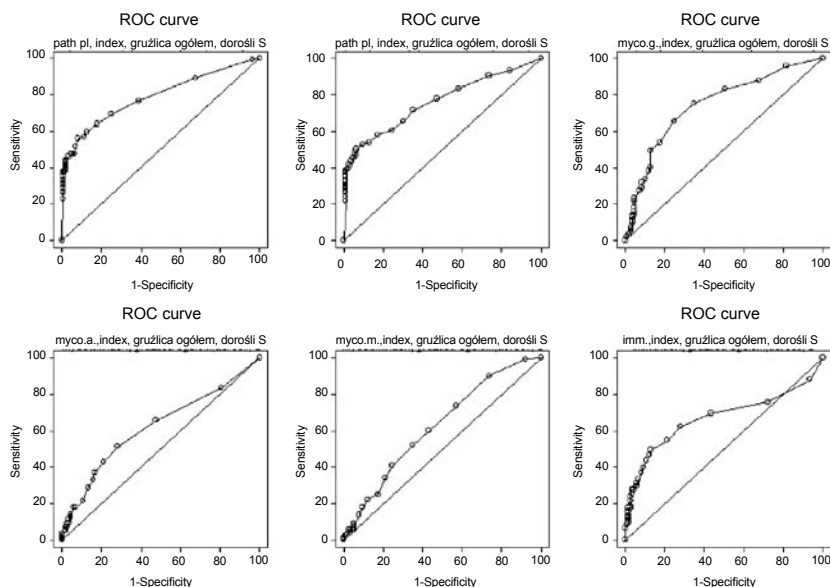
Wartość diagnostyczną badanych testów oceniono w grupie wszystkich chorych na gruźlicę łącznie, w gruźlicy płuc, gruźlicy pozapłucnej oraz w gruźlicy u dzieci.

Na podstawie analizy ROC wyznaczono poziomy odcięcia badanych testów (rycina 45). Obliczone pola pod krzywą ROC dla badanych testów

były następujące: IgG anty 38-kDa: 0,81; IgG anty 38 + 16-kDa: 0,79; IgG anty 38-kDa + LAM: 0,76; IgA anty 38-kDa + LAM: 0,63; IgM anty 38-kDa + LAM: 0,62; IgG anty A60: 0,69.

Czułość, swoistość, wartość predykcyjną dodatnią (PPV) i ujemną (NPV) badanych testów oraz wyniki fałszywie dodatnie (FP) w wykrywaniu wszystkich postaci gruźlicy u dorosłych prezentuje tabela IV.

Najwyższą czułość, swoistość i wartość predyki dodatniej uzyskano dla testów opartych na antygenach rekombinowanych swoistych dla *Tuberculosis complex*. Testy oparte na nieswoistych antygenach prątka (LAM, A60) prezentowały znacznie niższą swoistość przy zbliżonej czułości. Najniższą czułość i swoistość prezentował test wykrywający przeciwciała w klasie IgM. Najbardziej czuły był test bazujący na przeciwciałach klasy IgA, jednakże jego swoistość była znacznie obniżona w stosunku do klasy IgG. Czulość obliczona łącznie dla klasy IgG i IgA wynosiła 70%, jednak przy obniżeniu swoistości do 71%. Dołączenie dodatkowo klasy IgM nie poprawiło czułości testów anty 38-kDa + LAM w wykrywaniu gruźlicy. Przy wyznaczonych poziomach odcięcia wyniki fałszywie dodatnie testów 38-kDa oraz 38 + 16-kDa uzyskano u 4 chorych (w tym 3 przypadki chorych na sarkoidozę). Swoistość obu testów wynosiła 98%. W przypadku testów 38-kDa i LAM oraz A60 swoistość była znacznie niższa. Wyniki fałszywie dodatnie (FP) obserwowano u chorych na sarkoidozę, MOTT oraz w niegruźliczych zakażeniach, raku i u osób zdrowych (tabela IV).



Ryc. 45. Krzywe ROC dla wszystkich badanych testów w grupie dorosłych.

Tab. IV Charakterystyka badanych testów w grupie dorosłych chorych na gruźlicę wszystkich postaci.

Test	Czułość	Swoistość	PPV	NPV	FP
IgG 38-kDa	51%	98%	96%	59%	3 BBS, 1 NIESP
IgG 38 + 16-kDa	50%	98%	96%	56%	3 BBS, 1 MOTT
IgG 38-kDa+LAM	43%	86%	79%	52%	3 BBS, 4 MOTT, 6 NIESP, 2 CA
IgA 38-kDa+LAM	63%	81%	77%	50%	1 BBS, 5 MOTT, 6 NIESP, 1 ZDR
IgM 38-kDa+LAM	32%	81%	68%	48%	1 BBS, 5 MOTT, 8 NIESP, 3 ZDR, 6 CA
A-60	55%	92%	88%	62%	3 BBS, 4 MOTT, 4 NIESP, 3 ZDR

Czułość badanych testów w grupie chorych na gruźlicę płuc oraz w wybranych podgrupach prezentuje tabela V.

Czułość testów opartych na antygenach rekombinowanych wynosi 54% i 56%. Najwyższą czułość prezentuje test oparty na klasie IgA, a najniższą (jedynie 34%) test IgM. We wszystkich przypadkach czułość testów u chorych prątkujących (BK+) jest znacznie wyższa niż w przypadku gruźlicy niepotwierdzonej bakteriologicznie (BK-). Różnica ta jest najwyższa dla testów wykrywających przeciwciała IgG, a niewielka w przypadku klasy IgM.

Tab. V Czułość badanych testów w grupie dorosłych chorych na gruźlicę płuc.

Test	Łącznie	BK+	BK-	Nowy	Chronik	Wznowa
IgG 38-kDa	55%	61%	27%	35%	74%	39%
IgG 38+16-kDa	54%	59%	23%	36%	71%	57%
IgG 38 kDa+LAM	46%	48%	32%	35%	50%	46%
IgA 38-kDa+LAM	66%	69%	50%	45%	52%	54%
IgM 38-kDa+LAM	34%	37%	31%	37%	15%	23%
A-60	58%	66%	21%	43%	69%	49%

Porównując czułość testów u chorych o różnym przebiegu klinicznym choroby, najwyższą czułość obserwowano w grupie chorych z wznową procesu gruźliczego (za wyjątkiem klasy IgM). W grupie chorych ze wznową procesu gruźliczego czułość testów była nieznacznie wyższa niż w nowych przypadkach, również za wyjątkiem klasy IgM.

Wartość diagnostyczną testów serologicznych oceniono w gruźlicy pozapłucnej łącznie oraz w podgrupach. Najwyższą czułością odznaczały się testy oparte na klasie IgG. Czuość w klasie IgM była bardzo niska (15%). Najwyższą czułość w klasie IgG uzyskano w grupie chorych na gruźlicę nerek i gruźlicę obwodowych węzłów chłonnych. Jednakże ze względu na niewielką liczebność badanych podgrup wyniki te mogą być traktowane jedynie jako przybliżone (tabela VI).

Wyznaczenie poziomu odcięcia dyskryminującego wyniki

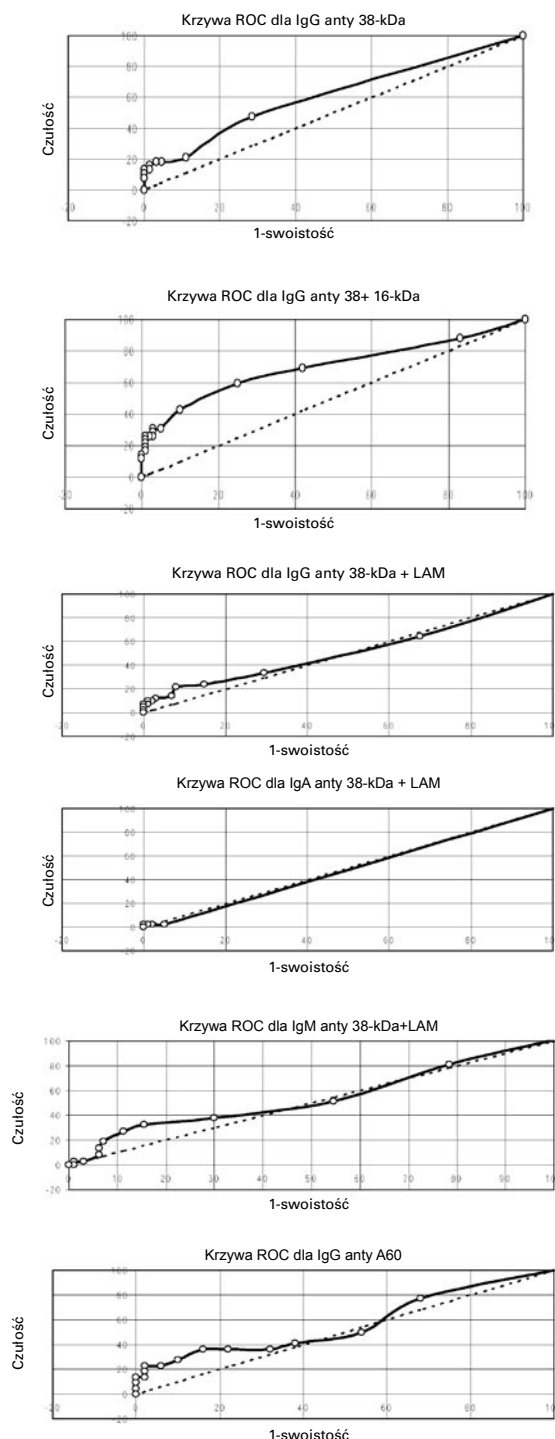
Tab. VI Czulość badanych testów w grupie dorosłych chorych na gruźlicę pozapłucną.

Test	Łączenie	Kości	Nerki	Węzły	Oplucna
IgG 38-kDa	42%	49%	50%	66%	44%
IgG 38 + 16-kDa	42%	56%	65%	40%	43%
IgG 38-kDa+LAM	44%	45%	65%	50%	50%
IgA 38-kDa+LAM	30%	30%	50%	15%	30%
IgM 38-kDa+LAM	15%	10%	0%	25%	19%
A-60	52%	52%	100%	–	40%

dotądnie od ujemnych w grupie dzieci oparto na analizie ROC. Jednakże, przeciwnie niż u dorosłych, przebieg krzywych (za wyjątkiem testu 38 + 16-kDa) nie pozwalał na wyznaczenie poziomu odcięcia określającego największą dokładność testów (rycina 46).

Czulość testów IgG (15-24%) i IgA (jedynie 9%) oraz wartość predykcji dodatniej i ujemnej są znacząco niższe w diagnostyce gruźlicy u dzieci w porównaniu do grupy dorosłych. Swoistość testów u dzieci i u dorosłych jest porównywalna. Wyniki fałszywie dodatnie obserwowano w grupie dzieci zakażonych prątkiem gruźlicy, w przypadku niegruźliczych zakażeń układu oddechowego oraz w przypadku testów opartych na antygenie LAM, u dzieci zdrowych. Czulość testu IgM w grupie dzieci wynosiła 30% i była porównywalna z czulością tego testu u dorosłych (tabela VII).

Dokonując podziału badanej grupy dzieci na 2 grupy wiekowe wykazano, że czulość badanych testów w grupie poniżej 10 roku życia była bardzo niska we wszystkich klasach przeciwciał za wyjątkiem IgM. Porównano również wartość diagnostyczną badanych testów w różnych postaciach gruźlicy u dzieci. Wyróżniono grupę gruźlicy przebiegającej jedynie z zajęciem węzłów tchawiczo-oskrzelowych bez zajęcia miąższu płucnego, gruźlicę węzłowo-płucną oraz gruźlicę popierwotną. Czulość testów w gruźlicy popierwotnej u dzieci i nastolatków była zbliżona do czulości u dorosłych. Czulość testów w gruźlicy węzłowej była bardzo niska (0-14%) za wyjątkiem testu IgM (30%). (tabela VIII) Test oparty na IgM reprezentował najwyższą czulość we wszystkich podgrupach gruźlicy dziecięcej, jakkolwiek był najmniej swoisty (70%) (tabela VIII).



Ryc. 46. Krzywe ROC w grupie dzieci.

Tab.VII Charakterystyka badanych testów w wykrywaniu gruźlicy u dzieci.

Test	Czułość	Swoistość	PPV	NPV	FP
IgG 38-kDa	24%	97%	78%	62%	1 ZAK P, 2 NIESP
IgG 38 + 16-kDa	18%	99%	91%	71%	1 NIESP
IgG 38-kDa-+LAM	15%	92%	50%	67%	2 ZAK P, 6 NIESP
IgA 38-kDa-+LAM	9%	88%	33%	66%	1 ZAK P, 4 NIESP, 1 ZDR
IgM 38-kDa-+LAM	30%	70%	33%	66%	7 ZAK P, 4 ZDR 17 NIESP
A-60	17%	98%	83%	67%	1 NIESP

Tab. VIII Czułość badanych testów w różnych podgrupach u dzieci chorych na gruźlicę.

Test	Łącznie	<10 lat	>10 lat	WEŻ	WEŻ/PL	POP
IgG 38-kDa	24%	0%	42%	0%	30%	50%
IgG 38 + 16-kDa	18%	14%	36%	14%	31%	44%
IgG 38-kDa+LAM	15%	13%	27%	0%	33%	47%
IgA 38-kDa+LAM	9%	3%	15%	0%	9%	15%
IgM 38-kDa+LAM	30%	24%	50%	30%	26%	31%
A-60	17%	0%	25%	0%	21%	40%

(WEŻ – gruźlica węzłów tchawiczo – oskrzelowych, WEŻ/PL – gruźlica węzłowo-płucna, POP – gruźlica popierwotna)

Test immunochromatograficzny

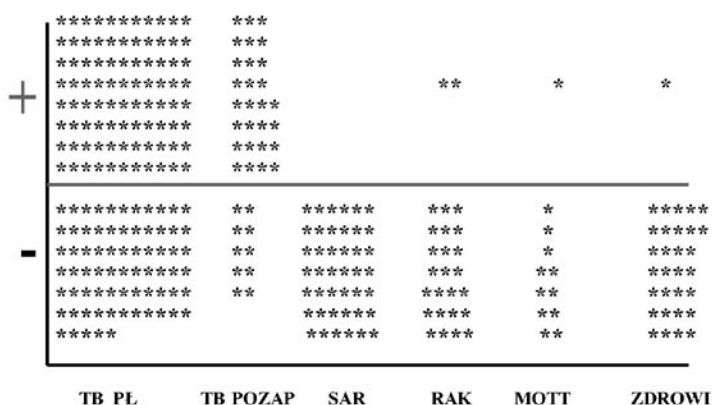
Test wykonano u 411 osób. W tym 339 dorosłych i 72 dzieci. W grupie dorosłych było 173 chorych na gruźlicę płuc, 38 chorych na gruźlicę pozapłucną, 87 chorych na inne choroby układu oddechowego (sarkoidoza 50 osób, rak płuca 25 osób, MOTT 12 osób), 17 chorych na niegruźlicze zakażenia kości i stawów oraz 36 zdrowych. W grupie dzieci było 37 chorych na gruźlicę dziecięcą oraz 35 dzieci chorych na astmę i nieswoiste zakażenia układu oddechowego.

Czułość testu Rapid TB w wykrywaniu gruźlicy płuc wynosiła 51%. Wyższą czułość stwierdzono w grupie chorych na gruźlicę pozapłucną (74%) (rycina 47).

Czułość testu immunochromatograficznego na poziomie 61% obserwowano w grupie chroniczków. W grupie nowych zachorowań czułość testu była niższa i wynosiła 35%. Nieco wyższą czułość (56%) odnotowano u chorych prątkujących. Czuość w nowych przypadkach, w których nie wyhodowano prątków wynosiła 25%. Swoistość testu Rapid wynosiła 97%. Tabela IX prezentuje wyniki testu Rapid w zestawieniu z testem ELISA opartym na tym samym antygenie. Obliczenia wykonane zostały dla tej samej grupy chorych na gruźlicę płuc.

W grupie dzieci czułość testu Rapid była znacznie niższa. W grupie wszystkich przypadków dzieci chorych na gruźlicę czułość wynosiła jedynie 22%. W grupie chorych na gruźlicę płuc czułość wynosiła 25% a w gruźlicy pozapłucnej 13% (tabela IX).

Swoistość testu u dzieci wynosiła 95%. Fałszywie dodatnie wyniki testu stwierdzono u 4 badanych (1 chory na mykobakteriozę, 2 chorych na raka płuca i u 1 osoby zdrowej) (rycina 47). W żadnym z tych przypadków nie stwierdzono aktywnej lub przebytej gruźlicy. U wszystkich osób z fałszywie dodatnim wynikiem Rapid test TB test wykonano test Pathozym TB complex oparty na metodzie immunoenzymatycznej (ELISA), który nie potwierdził



Ryc. 47. Dodatnie i ujemne wyniki testu immunochromatograficznego. (TB PL – gruźlica płuc, TB POZAP – gruźlica pozapłucna, SAR – sarkoidoza, RAK – rak płuca, MOTT – mykobakteriozy, ZDROWI – grupa osób zdrowych)

Tab. IX Porównanie czułości testu immunoenzymatycznego i immunochromatograficznego wykrywających przeciwciała anty 38-kDa.

	BK (+)	BK (-)	Nowe	Chron	Całkowita	Dzieci Całk	Dzieci Pozapł
RAPID	56%	25%	35%	61%	51%	22%	13%
ELISA	60%	32%	35%	64%	55%	24%	15%
N=	101	62	85	51	173	37	15

obecności znaczącego miana przeciwciał przeciwprątkowych skierowanych przeciwko antygenowi 38 kDa w żadnym przypadku. Zgodność pomiędzy testem paskowym a testem ELISA opartym na antygenie 38kDa przedstawia tabela X. W 89% przypadków za pomocą obu testów otrzymano zgodny wynik ujemny lub dodatni.

Tab. X Porównanie zgodności testu immunoenzymatycznego i immunochromatograficznego wykrywających przeciwciała anty 38-kDa.

Rapid	Elisa	
+	+	Zgodne
-	-	89%
+	-	Niezgodne
-	+	11%

Ocena poziomu przeciwciał przeciwprątkowych w BALF, płynie mózgowo-rdzeniowym, płynie osierdziowym i opłucnowym.

W BALF oceniono poziomy przeciwciał IgG przeciwko antygenom 38 + 16-kDa oraz IgG, IgA i IgM anty 38-kDa + LAM. Ze względu na brak wystandaryzowanej metody do oznaczania przeciwciał przeciwprątkowych w innych niż surowica płynach ustrojowych, badanie przeprowadzono porównując 3 różne rozcieńczenia płynu BALF: (1:1, 1:10, 1:50 dla testu Pathozone Plus oraz 1:1, 1:10, 1:100 dla testów Myco). Rozcieńczenia 1:50 lub 1:100 są zalecane do badania surowic. Ze względu na rozcieńczenie BALF solą fizjologiczną w trakcie wykonywania popłuczyn, oraz znacząco niższy poziom biał-

ka w stosunku do surowicy, oceniono również rozcieńczenie 1:10 oraz BALF nierozcieńczony.

Średni poziom IgG anty 38+16-kDa przy rozcieńczeniu 1:1 wynosił 773 ± 154 U/ml w grupie gruźlicy ($n=49$) i 506 ± 70 U/ml dla kontroli ($n=98$).

Przy rozcieńczeniu 1:10 średnie poziomy wynosiły odpowiednio 212 ± 1 U/ml i $21,5 \pm 1,6$ U/ml ($p < 0,05$). Dla rozcieńczenia 1:50 obliczone poziomy przeciwciał wynosiły 94 ± 14 U/ml oraz $67 \pm 4,8$ U/ml.

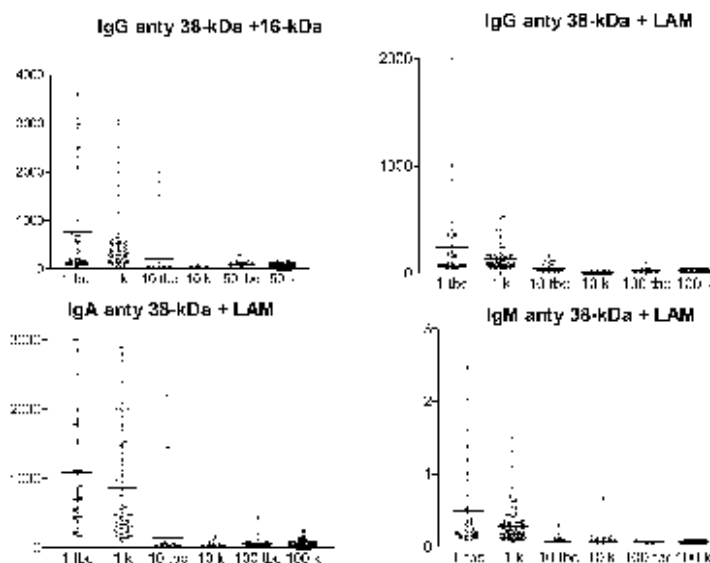
Dla klasy IgG anty 38-kDa+LAM poziomy przeciwciał dla gruźlicy/kontroli były następujące: 1:1 234 ± 63 U/ml ($n=54$) i 125 ± 11 U/ml ($n=112$). Dla rozcieńczenia 1:10 poziom przeciwciał wynosił odpowiednio $47,6 \pm 7$ U/ml i $3,2 \pm 0,2$ U/ml. Różnica pomiędzy grupą gruźlicy a grupą kontrolną była istotna ($p < 0,0001$). Dla najwyższego rozcieńczenia przeliczone miana wynosiły odpowiednio 25 ± 3 U/ml oraz $21 \pm 0,5$ U/ml.

Porównując miana przeciwciał klasy IgA otrzymano następujące wyniki. Rozcieńczenie 1:1 dla gruźlicy: 1091 ± 140 U/ml ($n=41$), kontrola: 874 ± 87 U/ml ($n=89$). Dla rozcieńczenia 1:10 gruźlica: 144 ± 88 U/ml, kontrola: $19 \pm 2,6$ U/ml ($p < 0,05$). Dla rozcieńczenia 1:100 gruźlica: $62,0,4 \pm 15$ U/ml, kontrola: $47,5 \pm 4$ U/ml.

Dla klasy IgM średnie indeksów gęstości optycznej były następujące. Dla rozcieńczenia 1:1 gruźlica: $0,5 \pm 0,09$ ($n=41$), kontrola: $0,28 \pm 0,02$ ($n=89$). Dla rozcieńczenia 1:10 gruźlica: $0,08 \pm 0,008$, kontrola: $0,08 \pm 0,007$. Dla rozcieńczenia 1:100 gruźlica: $0,06 \pm 0,001$, kontrola: $0,006 \pm 0,0006$. Różnice pomiędzy grupą gruźlicy a kontrolą były nieistotne (rycina 48).

Ryc. 48. Poziomy przeciwciał ocenione płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego o różnych rozcieńczeniach.

(1 tbc – BAL nierozcieńczony u chorych na gruźlicę, 1 k – BAL nierozcieńczony w grupie kontrolnej, 10 tbc – rozcieńczenie 1:10 w grupie chorych na gruźlicę, 10 k – rozcieńczenie 1:10 w grupie kontrolnej, 50 (100) tbc – rozcieńczenie 1:50 (100) w grupie chorych na gruźlicę, 50 (100) k – rozcieńczenie 1:50 (100) w grupie kontrolnej).



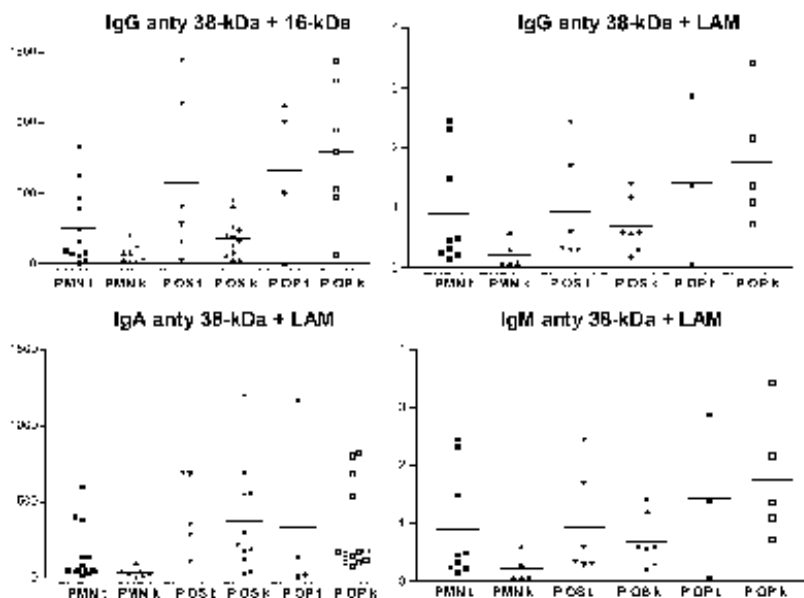
Podobnie jak w BALF poziom przeciwciał oceniono również w płynie mózgowo-rdzeniowym, płynie osierdziowym oraz opłucnowym. Ze względu na małą liczebność badanych grup doświadczenia należy traktować jako pilotowe. Płyn mózgowo-rdzeniowy – średni poziom przeciwciał IgG anty 38 + 16-kDa w gruźlicy wynosił 150±47 U/ml (n=13), dla kontroli wynosił 38±12U/ml (n=9) ($p<0,05$). IgG anty 38-kDa + LAM w grupie gruźlicy: 256±65 U/ml (n=9), w grupie kontrolnej: 73,5±16 U/ml (n=5); IgA anty 38-kDa + LAM gruźlica: 599,7±231 U/ml (n=14), kontrola: 1925±851 U/ml (n=8), dla klasy IgM anty 38-kDa + LAM gruźlica: 0,914±0,3 (n=9) kontrola: 0,22±0,1 U/ml (n=5).

W przypadku płynu osierdziowego uzyskano następujące wyniki: IgG anty 38 + 16kDa w grupie

gruźlicy: 424±114 U/ml (n=6), kontrola: 371±106 U/ml (n=11), IgG anty 38-kDa + LAM gruźlica: 574,8±112 U/ml (n=6), kontrola: 185,5±66,5 U/ml (n=9), IgA anty 38-kDa + LAM gruźlica: 684,7±312 U/ml (n=6), kontrola: 582±167 U/ml (n=11), IgM anty 38-kDa + LAM gruźlica: 0,95±0,37 (n=6), kontrola: 69±0,16 (n=9).

Płyn opłucnowy – IgG anty 38 + 16kDa gruźlica: 336±279 U/ml (n=5), kontrola: 313±78 U/ml (n=8), IgG anty 38-kDa + LAM gruźlica: 660,6±793 U/ml (n=4), kontrola: 793±144 U/ml (n=7), IgA anty 38-kDa + LAM – gruźlica: 980,5±417 U/ml (n=6), kontrola: 1770±774 U/ml (n=13) oraz IgM anty 38-kDa + LAM – gruźlica: 1,44±0,8 (n=4) kontrola: 1,7±0,43 (n=6) (rycina 49).

Ryc. 49. Poziomy przeciwciał w płynie opłucnowym, mózgowo-rdzeniowym i osierdziowym. (PMR – płyn mózgowo-rdzeniowy, P OS – płyn osierdziowy, P OP – płyn opłucnowy, t – gruźlica, k- kontrola)



Omówienie wyników

Różnorodność manifestacji klinicznych i lokalizacji gruźlicy, od bezobjawowego zakażenia aż do postaci uogólnionej, wielonarządowej, odzwierciedla stan równowagi pomiędzy prątkiem a układem odpornościowym gospodarza. Życiowe ryzyko rozwoju choroby u osoby zakażonej wynosi jedynie 5-10% (1, 2, 5). Choroba rozwija się najczęściej w ciągu pierwszych 2 lat po zakażeniu (gruźlica pierwotna), ale może również rozpocząć się później (gruźlica popierwotna) (4). Gruźlica może dotyczyć każdego miejsca w ustroju, chociaż zazwyczaj zajmuje układ oddechowy. Czynna gruźlica płuc może przybierać różne formy: od łagodnego, samoograniczającego się nacieku aż do ciężkiej, niszczącej postaci jamistej. Odpowiedź immunologiczna jest najważniejszym czynnikiem determinującym przebieg zakażenia (9, 27, 26). Jest ona uwarunkowana szeregiem czynników zarówno wrodzonych (podłoże genetyczne) jak i nabytych (środowisko i warunki życiowe, stan odżywienia, choroby współistniejące i ich leczenie, wiek, szczepienia ochronne) (26, 80, 81). Powszechnie przyjmuje się, że odporność na zachorowanie wiąże się z odpowiedzią typu komórkowego, natomiast ciężkie rozsiane postaci choroby korelują z odpowiedzią typu humoralnego (19, 27, 21, 30, 32). Tradycyjnie najważniejszą rolę w obronie przeciwprątkowej przypisuje się nabytej odpowiedzi limfocytów T (23, 26, 53). Popularną teorią tłumaczącą patogenezę gruźlicy jest paradygmat Th1/Th2 (34, 82). Odpowiedź typu Th1, jakkolwiek dominująca, nie jest jednak jedynym mechanizmem determinującym odporność na zakażenie prątkiem (32). Próby manipulowania układem Th1/Th2 w gruźlicy, ale także w wielu innych chorobach, nie powiodły się (19, 82). Co więcej naruszenie delikatnej równowagi cytokinowej może mieć dramatyczne konsekwencje, czego przykładem są zachorowania na gruźlicę po leczeniu antagonistami TNF α (83). Od wielu lat jednym z dogmatów immunopatologii gruźlicy było twierdzenie, że odpowiedź humoralna nie odgrywa istotnej roli w obronie przed zachorowaniem (30). Za pomocą transferu surowicy nie udało się przenieść odporności ze zwierząt zakażonych na zdrowe (30). Nie wykazano również zwiększonej zapadalności na gruźlicę u osób z niedoborami przeciwciał (23). Wydaje się jednak, że rzeczywistość jest dużo bardziej złożona. Zarówno mechanizmy komórkowe jak i produkcja przeciwciał służą do obrony przed zakażeniami. Twierdzenie, że w gruźlicy tylko jeden z mechanizmów miałby być wykorzystany, a drugi byłby zbędnym lub nawet szkodliwym „pro-

duktem ubocznym” wydaje się mało logiczne. Rola przeciwciał w patologii gruźlicy jest nadal niejasna. Wykrycie istniejących powiązań może rzucić nowe światło na zagadnienia związane z immunopatologią gruźlicy, otworzyć nowe możliwości diagnostyczne czy też nowe możliwości profilaktycznej i terapeutycznej immunointerwencji (30). Celem niniejszej pracy była próba poszukiwania zależności pomiędzy odpowiedzią humoralną na antygeny prątka a klinicznym spektrum choroby. Porównano odpowiedź immunologiczną na wybrane antygeny prątka w różnych postaciach gruźlicy i odpowiadającym im grupach kontrolnych zarówno w aspekcie poznawczym jak i diagnostycznym.

Gruźlica u dorosłych – analiza wszystkich przypadków łącznie

Oceniono odpowiedź humoralną w grupie wszystkich chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy kontrolnej. Ze względu na etiologię związaną z zakażeniem prątkami niegruźliczymi osobno oceniono odpowiedź humoralną u chorych na mykobakteriozy. Średnie miana wszystkich badanych przeciwciał w grupie gruźlicy były istotnie wyższe w stosunku do kontroli. Równocześnie w grupie gruźlicy obserwowano duży rozrzut wyników jednostkowych i bardzo niskie miana przeciwciał u niektórych chorych. Oznacza to, że odpowiedź humoralna na antygeny prątka jest heterogenna, a część chorych na gruźlicę nie produkuje przeciwciał przeciwprątkowych. Grupa chorych, u których nie wykryto przeciwciał przeciwprątkowych nie wykazywała istotnych odrębności w zakresie czynników związanych z przebiegiem choroby. Brak odpowiedzi na dany antygen jest przypisywany immunosupresji związanej z działaniem produktów prątka na organizm gospodarza lub genetycznie uwarunkowanej niezdolności do rozpoznania antygeny (25, 84). Niektórzy autorzy uważają również, że antygeny prątka mogą wchodzić w skład kompleksów immunologicznych antygen-przeciwciało i z tego powodu nie są wykrywane standardowymi metodami w części przypadków (28, 84, 85). Uma Devi i wsp. wykazali obecność IgG anty 38-kDa u 95% chorych na gruźlicę, po uwzględnieniu sekwestracji przeciwciał w obrębie kompleksów (84). Wartościowym spostrzeżeniem w aspekcie diagnostycznym jest fakt, iż bardzo wysokie miana przeciwciał przeciwko antygenom rekombinowanym odnotowano jedynie u chorych na gruźlicę.

Obserwowano natomiast duże rozproszenie wyników testów opartych na A60 i LAM oraz znacznie podwyższone poziomy przeciwciał przeciwko tym antygenom u kilku osób w grupach kontrolnych (zarówno zdrowych jak i chorych na inne choroby). Zatem prawdopodobnie na odpowiedź anty-LAM oraz anty-A60 ma wpływ również szereg nieznanych czynników osobniczych i środowiskowych niezależnych od obecności czynnego procesu gruźliczego (25, 86, 87). Średnie miana wszystkich badanych przeciwciał w grupie mykobakterioz również przewyższyły grupę kontrolną, a w przypadku wszystkich testów opartych na LAM także grupę gruźlicy. Obserwowane różnice w niektórych przypadkach nie były znamienne statystycznie, co można tłumaczyć małą liczebnością grupy chorych na mykobakteriozy (20 osób) oraz dużym rozrzutem pojedynczych wyników. Porównując jednostkowe wyniki można zauważyć, że w przypadku antygeny LAM oraz A60 niektóre wyniki u chorych z grupy mykobakterioz oraz z grupy kontrolnej są bardzo wysokie. Szczególnie wysokie miana anty-LAM u niektórych chorych w grupie MOTT można wytłumaczyć obecnością antygeny LAM w organizmie wszystkich prątków, również niegruźliczych (25, 61). Zatem chorzy na mykobakteriozy poddani są intensywnej stymulacji przez ten antygen. Obecność LAM oraz A60 w organizmie saprofitycznych prątków w środowisku może tłumaczyć podwyższone miana przeciwciał w grupie kontrolnej. Niektórzy autorzy sugerują, że na podwyższone miana przeciwciał anty A60 wpływ mogą mieć również szczepienia BCG (74, 88). Jedna spośród zdrowych osób dorosłych, wchodzących w skład grupy kontrolnej, poddała się dwukrotnie szczepieniom BCG. Powodem szczepienia była obawa przed zachorowaniem na gruźlicę w związku z zawodowym kontaktem z chorymi. U tej osoby poziom przeciwciał anty-A60 był znacznie podwyższony. Inni autorzy potwierdzili wpływ rewakcytacji BCG na poziom przeciwciał anty-A60 u dorosłych (74, 88). Nie obserwowano natomiast wysokich poziomów przeciwciał anty-38-kDa w grupie chorych na mykobakteriozy i w grupie kontrolnej. Antygen 38-kDa występuje jedynie w grupie *Tuberculosis complex*, a więc nie ma go w prątkach wywołujących mykobakteriozy w naszej populacji. Ekspresja antygeny 38-kDa w organizmie prątków szczepu BCG jest około 10 razy słabsza niż w przypadku *M. tuberculosis*, dlatego nie obserwuje się wpływu szczepień na odpowiedź anty-38-kDa (89). W grupie wszystkich chorych na gruźlicę oceniono korelację pomiędzy IgG, IgA i IgM anty 38-kDa + LAM. Stwierdzono obecność wysoce znamiennej korelacji pomiędzy poziomem

przeciwciał IgA i IgG natomiast brak korelacji pomiędzy IgM a pozostałymi klasami immunoglobulin u tych samych chorych. Obserwacje te dowodzą, że wtórna odpowiedź immunologiczna na antygeny prątku w klasie IgA i IgG przebiega równolegle, natomiast mechanizmy odpowiadające za produkcję IgM (odpowiedź pierwotna) są odmienne. Wysoki stopień korelacji pomiędzy IgG i IgA w gruźlicy (u 75% chorych) obserwowali też inni autorzy (31).

Gruźlica płuc u dorosłych

W grupie dorosłych chorych na gruźlicę płuc dokonano analizy wpływu czynników osobniczych oraz związanych z przebiegiem choroby na odpowiedź humoralną. Spośród czynników osobniczych zbadano wpływ wieku i płci. U dorosłych obserwowano ujemną korelację pomiędzy wiekiem a poziomem przeciwciał klasy IgG i IgM anty 38-kDa + LAM. Oznacza to, że z każdym rokiem życia zdolność do produkcji przeciwciał przeciwprątkowych malała. Wiek pozostał czynnikiem istotnym dla tych dwóch klas przeciwciał po analizie uwzględniającej równoczesny wpływ wielu innych czynników na poziom badanych immunoglobulin. Zatem sam proces starzenia był czynnikiem istotnie i bezpośrednio modulującym odpowiedź humoralną. Dla przeciwciał klasy IgM jest to zjawisko stosunkowo łatwo wytłumaczalne. IgM jest zazwyczaj kojarzone z wczesną fazą odpowiedzi humoralnej na antygen natomiast gruźlica u dorosłych jest na ogół wynikiem reaktywacji zakażenia, do którego doszło wiele lat wcześniej. Statystyki epidemiologiczne wskazują, iż w naszej populacji największą zapadalność na gruźlicę obserwuje się właśnie wśród osób w starszym wieku. Spadek miana przeciwciał IgG dowodzi, że najprawdopodobniej nie jest to jednak związane z większą skłonnością do odpowiedzi typu Th2 na antygeny prątku u osób starszych. Może to być zjawisko bezpośrednio związane ze starzeniem się układu immunologicznego (90). Wykazano, że zdolność osobnicza do produkcji przeciwciał w odpowiedzi na stymulację antygenową maleje z wiekiem (90). Powolny spadek rozpoczyna się już w chwili osiągnięcia dojrzałości płciowej. Najbardziej istotnym czynnikiem ulegającym upośledzeniu w starszym wieku jest funkcja limfocytów T (90). Zjawisko to jest zależne od involucji grasicy. Niedobór funkcjonalny pomocniczych limfocytów T sterujących funkcją limfocytów B prowadzi do zaburzeń regulacji produkcji przeciwciał (90). Najwyższa zapadalność na gruźlicę u osób starszych, wbrew hipotezie

o biegunowości odpowiedzi immunologicznej, nie jest związana z dominacją odpowiedzi humoralnej, lecz raczej ze stopniowym wygasaniem wszelkich funkcji układu odpornościowego.

Czynnikiem modyfikującym produkcję przeciwciał była również płeć chorych. Średnie miano przeciwciał u mężczyzn było istotnie wyższe w klasie IgG anty-38-kDa oraz anty-A60. Przeciwnie, w przypadku klasy IgM miano było znacząco wyższe u kobiet. Poddając otrzymane wyniki analizie regresji wykazano, że płeć była czynnikiem niezależnie modyfikującym odpowiedź humoralną IgG anty A60 oraz IgM. Oceniając wyniki analizy jednoczynnikowej można by przypuszczać, że w grupie mężczyzn było relatywnie więcej przypadków rozległych i zaawansowanych zmian chorobowych niż w grupie kobiet. Jednakże po uwzględnieniu wszystkich czynników związanych z procesem chorobowym, postacią choroby oraz przebiegiem klinicznym, płeć pozostała czynnikiem istotnie wpływającym na odpowiedź IgG anty A60 (3,67 razy wyższe miano w grupie mężczyzn) oraz IgM (1,4 razy wyższe miano w grupie kobiet). Powszechnie znanym zjawiskiem jest zwiększona zapadalność na gruźlicę u dorosłych mężczyzn w porównaniu do kobiet. Dotyczy ona zarówno krajów biednych jak i dobrze rozwiniętych. Przyczyna tego zjawiska wydaje się być złożona. W krajach zaniedbanych gospodarczo zjawisko to tłumaczy się różnicami w dostępie kobiet i mężczyzn do opieki zdrowotnej. Badania socjologiczne prowadzone w Indiach potwierdziły, że kobiety są z reguły w gorszej sytuacji finansowej, a także rzadziej poszukują pomocy medycznej w obawie przed stygmatem związanym z chorobą. Zmniejsza to ich szanse na założenie rodziny lub też naraża na ryzyko opuszczenia przez mężów i innych krewnych, podczas gdy mężczyźni w tej samej sytuacji oczekują wsparcia i opieki od swoich żon (91). Z tych powodów uważa się, że w krajach zaniedbanych gospodarczo bardzo ważną przyczyną różnicy w zapadalności może być niedorejestrowanie nowych zachorowań u kobiet (91, 92). Jednakże podobne trendy epidemiologiczne obserwuje się w krajach rozwiniętych. Można je częściowo tłumaczyć różnicami w trybie życia obu płci (nałogi, większe zaniedbania zdrowotne i społeczne w grupie mężczyzn, częstsze u mężczyzn inne choroby zwiększające zapadalność na gruźlicę jak cukrzyca, pylice, rak płuca, choroby wątroby) (92). Wydaje się jednak, że poza czynnikami społecznymi istnieją czynniki biologiczne warunkujące różnice w zapadalności u obu płci. Większą zapadalność w grupie mężczyzn notuje się po okresie pokwitania (92). Uważa się, że istotną

rolę odgrywają czynniki (na przykład hormonalne), nieobecne przed okresem dojrzewania, modyfikujące odpowiedź immunologiczną na antygeny prątka. Ciekawym zjawiskiem jest fakt, iż różnica pomiędzy kobietami a mężczyznami w zapadalności na gruźlicę pojawia się po okresie dojrzewania i stopniowo zanika u osób starych (92). Dane WHO wskazują, że stosunek zachorowań chłopców do dziewczynek poniżej 15 roku życia wynosi 1,1, następnie stopniowo rośnie do 3,0 w wieku 45-54 lata a następnie maleje do 1,4 powyżej 64 roku życia (92). Sugeruje się, że różnice w odpowiedzi immunologicznej na antygeny prątka związane są z wpływem hormonów płciowych, działających ochronnie u kobiet w wieku rozrodczym. W badaniach na zwierzętach wykazano różnice w odpowiedzi immunologicznej i odporności na zakażenie prątkami u samców i samic (93, 94, 95). Badania na zwierzętach i u człowieka wykazały, że estrogeny stymulują produkcję INF γ a także funkcje cytolityczne limfocytów CD4 i CD8 (93, 94). Obserwowano różnice pomiędzy samcami i samicami w odporności na zakażenie prątkami *M. marinum*. Samce były bardziej wrażliwe na zakażenie, a także obserwowano u nich więcej kolonii bakteryjnych w płucach i śledzionie i wyższą śmiertelność niż u samic (95). Kastracja powodowała znaczący wzrost odporności na zakażenie, a suplementacja testosteronu odwracała ten efekt (95). Można zatem przypuszczać, że mężczyźni są bardziej skłonni do odpowiedzi immunologicznej promującej rozwój choroby, powiązanej ze stymulacją produkcji przeciwciał klasy IgG. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono prac porównujących odpowiedź humoralną na antygeny prątka w obu płci. Ciekawym zjawiskiem jest przeciwstawność odpowiedzi w klasie IgG i IgM powiązana z wiekiem i płcią chorych. Znamienne podwyższony poziom IgM może świadczyć o większej częstości występowania wcześniejszych postaci gruźlicy u kobiet. Zjawisko to może przebiegać subklinicznie, gdyż za pomocą analizy wieloczynnikowej nie udało się go potwierdzić.

W niniejszej pracy dokonano również analizy czynników związanych z przebiegiem klinicznym choroby takich jak: postać choroby, obraz kliniczny, obecność lub brak prątkowania oraz rozległość radiologiczna. Czynnikiem, który najsilniej wpływał na produkcję wszystkich badanych przeciwciał, za wyjątkiem IgM, była rozległość radiologiczna zmian w płucach. Poddając ten sam parametr analizie wieloczynnikowej wykazano, że jest on czynnikiem niezależnie wpływającym na produkcję wszystkich badanych przeciwciał w klasie IgG, za wyjątkiem A60. Istotna różnica była obserwowana

między grupą chorych z zajęciem jednym polem płucnym a grupą z dwoma polami objętymi procesem chorobowym, a także między grupą z dwoma a grupą z zajęciem więcej niż trzema polami płucnymi. Odpowiedź immunologiczna dla klasy IgG anty 38 + 16-kDa oraz 38-kDa + LAM była ponad 4 razy silniejsza u chorych ze zmianami zajmującymi powyżej 3 pól płucnych a chorymi, u których zajęte było tylko 1 pole płucne. Podobne zjawiska były już obserwowane przez innych autorów (25, 96, 97, 98). Zatem rozległość zmian jest czynnikiem bardzo silnie wpływającym na odpowiedź humoralną. Znaczna rozległość zmian może wynikać z osłabienia miejscowej odpowiedzi typu komórkowego ograniczającej proces chorobowy. Takie zjawisko obserwuje się u chorych z immunosupresją, wtedy przebiega ono również z upośledzeniem odpowiedzi typu humoralnego. Możliwym wytłumaczeniem znacznej rozległości zmian jest również wieloletni stały postęp nieleczonej choroby u osób bez zaburzeń immunologicznych. W pierwszej sytuacji odpowiedź humoralna jest nieistniejąca lub bardzo słaba, natomiast w drugim przypadku wtórna odpowiedź humoralna (w klasie IgG i IgA) jest nasiloną, co może wynikać z długotrwałej stymulacji antygenowej. Zatem można przypuszczać, że istotnym czynnikiem wpływającym na odpowiedź humoralną jest intensywność oraz czas trwania stymulacji antygenowej. Progresję choroby tłumaczy także teoria polaryzacji odpowiedzi immunologicznej z przesunięciem w stronę odpowiedzi humoralnej, nieskutecznej dla zwalczania zakażenia (99). Nasuwa się zatem pytanie, czy przesunięcie równowagi w stronę odpowiedzi humoralnej jest zjawiskiem pierwotnym, a postęp choroby wtórnym, czy odwrotnie.

Przebieg choroby był czynnikiem modyfikującym produkcję przeciwciał w przypadku IgG anty-38-kDa, 38 + 16-kDa i A60. Najwyższe średnie miana przeciwciał stwierdzono w grupie chroników, najniższe w nowych przypadkach. Po zastosowaniu analizy regresji okazało się, że czynnik ten niezależnie wpływał na miano przeciwciał 38-kDa (średnie miano przeciwciał u chroników 3,24 razy wyższe niż w nowych przypadkach) oraz 38 + 16-kDa (w grupie chroników średnie miano 2,36 razy wyższe). Podobnie jak w przypadku rozległości procesu chorobowego prawdopodobnym wytłumaczeniem tego zjawiska jest długotrwałość i intensywność stymulacji antygenowej w grupie chroników. Do grupy chroników zaliczono chorych poddanych wielu próbom niesystematycznego leczenia, przewlekle prątkujących, często wydalających prątki odporne na podstawowe leki przeciwprątkowe.

Kilku chorych z tej grupy zmarło w toku leczenia przeciwprątkowego. Można przypuszczać, że wzrastający ładunek antygenów prątka w organizmie tych chorych był przyczyną postępującej supresji odpowiedzi komórkowej i dominacji odpowiedzi humoralnej. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono analizy odpowiedzi humoralnej w grupie chorych przewlekle prątkujących.

Obecność prątkowania była czynnikiem istotnie wpływającym na miano przeciwciał jedynie w przypadku antygenów rekombinowanych, średnie miano przeciwciał były znacząco wyższe w grupie chorych prątkujących. Po analizie wieloczynnikowej kryterium prątkowania okazało się istotne jedynie dla IgG anty 38-kDa. Średnie miano przeciwciał u chorych prątkujących były 1,84 razy wyższe niż u chorych nieprątkujących. Wyższe poziomy przeciwciał przeciwprątkowych u chorych prątkujących stwierdzili inni autorzy (31, 62). Mniejsze znaczenie obecności prątkowania w stosunku do innych czynników wydaje się być zjawiskiem dość zaskakującym. Wydawać by się mogło, że większa ilość prątków w organizmie wiąże się z większym ładunkiem antygenowym, co powinno silnie pobudzać produkcję przeciwciał. Wydaje się jednak, że czynniki osobnicze, związane z indywidualną odpowiedzią organizmu na zakażenie, są bardziej istotne niż czynniki związane z samym patogenem. Należy również wziąć pod uwagę immunosupresyjne działanie antygenów prątka przy masywnej ekspozycji.

Kolejną analizowaną kategorią była postać kliniczna choroby. Wyróżniono postać naciekową, rozsianą, włóknisto-jamistą oraz serowate zapalenie płuc. Nasilenie odpowiedzi humoralnej zależało od postaci choroby w przypadku wszystkich badanych przeciwciał za wyjątkiem IgM. We wszystkich przypadkach poziom przeciwciał w gruźlicy naciekowej był znacząco niższy niż w pozostałych podgrupach. Najwyższe miana występowały w gruźlicy włóknisto-jamistej. Po przeprowadzeniu analizy regresji postać kliniczna choroby nadal pozostała bardzo istotnym czynnikiem dla 3 klas przeciwciał: IgG anty A60 (postać włóknisto-jamista i rozsiew), dla IgG anty 38 + 16-kDa (postać włóknisto-jamista), oraz dla IgA (serowate zapalenie płuc). Najsilniejsza odpowiedź humoralna była związana z postacią włóknisto-jamistą. Jest to zaawansowana postać popierwotnej gruźlicy płuc. U chorych z tą postacią gruźlicy nasiloną odpowiedź humoralna mogła wynikać z długotrwałości choroby czy też być powiązana patogenetycznie z niezdolnością do eliminacji zakażenia i progresją do ciężkiej, zaawansowanej postaci. Obserwacje innych autorów potwierdza-

ją, że odpowiedź humoralna w gruźlicy zależy od stadium choroby (31, 62). W przypadku gruźlicy eksperymentalnej u zwierząt laboratoryjnych wykazano, że rozległość zmian w powiązaniu z podłożem genetycznym silnie modyfikuje produkcję przeciwciał (25, 96, 97, 99). W przypadku gruźlicy u ludzi również potwierdzono istnienie zależności pomiędzy rozległością zmian, a produkcją przeciwciał anty 32-kDa (100) oraz anty MTP40 (98). Inni autorzy wykazali, że odpowiedź immunologiczna przeciwko niskocząsteczkowym antygenom prątka rozwija się dopiero po wielu miesiącach (101). Obecność jamy była czynnikiem korelującym z nasileniem odpowiedzi humoralnej jedynie dla klasy IgG anty 38 +16 kDa. Pozostała ona czynnikiem istotnym po analizie wielowymiarowej. Być może obecność jamy nie miała istotnego wpływu na poziom większości badanych przeciwciał, gdyż do grupy chorych z obecnością jamy zaliczyliśmy również wszystkie przypadki gruźlicy naciekowej z rozpadem. Gruźlica naciekowa jest wczesną postacią choroby, a więc powiązaną ze słabszą odpowiedzią humoralną. Podwyższone poziomy IgG antyA60 w jamistej postaci gruźlicy w porównaniu z postacią naciekową i prosówką obserwowali inni autorzy (62). Mazzarella i wsp. porównali profil limfocytów w BALF pochodzącym z segmentów zajętych przez proces chorobowy u chorych z gruźlicą jamistą i niejami. U chorych z postacią jamistą dominowały limfocyty CD4 produkujące IL4, natomiast u chorych z postacią niejami dominowały limfocyty produkujące INF γ (102).

Podsumowując powyższe obserwacje należy podkreślić kilka istniejących prawidłowości. Bardzo znamienne jest przeciwstawne zachowanie się przeciwciał klasy IgM oraz IgG. W przypadku IgM u dorosłych nie zaobserwowano żadnych powiązań pomiędzy czynnikami związanymi z obrazem klinicznym choroby. Jedyne istniejące powiązania dotyczyły czynników osobniczych takich jak wiek i płeć. Wielu autorów sugerowało, że podwyższone poziomy IgM związane są z gruźlicą pierwotną oraz świeżą reaktywacją procesu chorobowego (25, 31). W badanej grupie zidentyfikowane przypadki gruźlicy pierwotnej u dorosłych były bardzo nieliczne i dlatego na ich podstawie nie można było wyciągnąć wiarygodnych wniosków. Nie obserwowano natomiast podwyższonych poziomów IgM w przypadku wczesnych postaci gruźlicy popierwotnej (gruźlica naciekowa, serowate zapalenie płuc) w stosunku do postaci zaawansowanych (gruźlica włóknisto-jamista). Na podstawie otrzymanych wyników można jedynie wnioskować, że mechanizmy sterujące odpowiedzią IgM są odmienne niż IgG. Podwyższone

poziomy tej immunoglobuliny w grupie kontrolnej sugerują, że produkcja przeciwciał IgM podlega raczej wpływom czynników zewnętrznych, na przykład kontaktom z prątkami ze środowiska, działaniu szczepień, a może nawet wynikać z zakażenia prątkiem gruźlicy bez rozwoju choroby (25). Przeciwciała klasy IgA korelują z odpowiedzią IgG jednakże ich synteza jest znacznie mniej zależna od przebiegu choroby. Istniejącą korelację potwierdzili także inni autorzy (31). Gupta i wsp. wykazali, że odpowiedź w klasie IgA anty A60 była silniejsza we wcześniejszych fazach choroby (31). Podobnie Alifano i wsp. obserwowali podwyższone poziomy IgA w gruźlicy prosówkowej w porównaniu z późną jamistą postacią choroby (62). Powyższe wnioski dotyczące porównania odpowiedzi IgG i IgA należy uzupełnić obserwacją, że obie klasy immunoglobulin były skierowane jedynie przeciwko antygenom 38-kDa + LAM. Jak już wcześniej wspomniano LAM jest antygenem szeroko rozpowszechnionym w organizmie prątków oraz innych bakterii patogennych i saprofitycznych obecnych w środowisku. Zatem na odpowiedź immunologiczną anty-LAM może mieć wpływ szereg czynników niezwiązanych z przebiegiem gruźlicy. Celem pełnej oceny odpowiedzi immunologicznej wartościowe byłoby zbadanie również przeciwciał IgA i IgM przeciwko antygenom rekombinowanym. Jednakże takie testy były niedostępne w chwili przeprowadzenia badania. Oceniając odpowiedź w klasie IgG należy podkreślić, że ten typ odpowiedzi najlepiej korelował z szeregiem parametrów klinicznych. Odpowiedź humoralna w klasie IgG zależała od rozległości, czasu trwania i nasilenia procesu chorobowego. Inni autorzy potwierdzili, że rozległość zmian i czas trwania zakażenia (choroby) jest, poza podłożem genetycznym, najsilniejszym czynnikiem modyfikującym produkcję przeciwciał (13, 25, 80). Otwartą kwestią pozostaje czy nasilone zmiany humoralne u chorych z ciężkimi postaciami gruźlicy są zjawiskiem pierwotnym czy wtórnym.

U wszystkich chorych na gruźlicę oceniono korelację pomiędzy poziomem badanych przeciwciał a wynikiem odczynu tuberkulinowego. We wszystkich przypadkach, również za wyjątkiem IgM, obserwowana korelacja była ujemna. Odczyn tuberkulinowy jest to naciek komórkowy obserwowany w miejscu wprowadzenia do uczulonego organizmu mieszaniny antygenów prątka gruźlicy pod postacią tuberkuliny. Odczyn tuberkulinowy jest klasycznym przykładem nadwrażliwości opóźnionej według Gella i Coombsa. Składnikiem tuberkuliny jest antygen A60 oraz LAM. Wynik odczynu tuberkulinowego (wielkość nacieku) uważany jest za

miarę odpowiedzi komórkowej na antygeny prątki. Obserwowana ujemna korelacja może świadczyć o istnieniu odwrotnej zależności pomiędzy odpowiedzią komórkową a humoralną w gruźlicy. Podobnie istnienie odwrotnej korelacji pomiędzy wielkością nacieku komórek uczulonych na tuberkulinę a odpowiedzią humoralną na antygeny prątki potwierdzili inni autorzy sugerując, że odpowiedź humoralna i komórkowa w gruźlicy są w genetycznie uwarunkowanej odwrotnej zależności (73). Inni autorzy wykazują jednak istnienie pewnego stopnia współzależności pomiędzy nadwrażliwością opóźnioną a odpowiedzią humoralną w gruźlicy. Wykazano bowiem, że czynnikiem niezbędnym do uruchomienia nadwrażliwości opóźnionej jest IL4, która jest kluczową cytokiną typu Th2 (103). Co więcej natywny antygen 38-kDa nasila produkcję IL4 u chorych na gruźlicę w porównaniu do osób zdrowych (82). Należy również podkreślić, że w gruźlicy, podobnie jak w innych chorobach ziarniniakowych istnieje kompartmentalizacja odpowiedzi komórkowej (104). Polega ona na przesunięciu komórek układu odpornościowego (głównie limfocytów T) z obwodu do miejsca przebiegu odpowiedzi immunologicznej. Z tego powodu odczyn tuberkulinowy może nie w pełni odzwierciedlać status immunologiczny osoby zakażonej. Dhand i wsp. obserwowali spadek liczby limfocytów, głównie limfocytów T we krwi obwodowej (104). Spadek ten korelował z rozległością procesu chorobowego i był największy w zaawansowanych postaciach. Nie obserwowano natomiast zależności pomiędzy parametrami odpowiedzi komórkowej a wiekiem, chociaż należy zaznaczyć, że przedział wiekowy wynosił jedynie 15-45 lat, a więc nie uwzględniono grupy osób najstarszych (104). Przeciwnie do zaburzeń we krwi obwodowej, zmiany komórkowe w BALF (liczba komórek, głównie limfocytów B i T) były tym bardziej nasilone im proces chorobowy bardziej zaawansowany (104). Wilkinson i wsp. porównywali odpowiedź humoralną i komórkową na antygen 38-kDa (49). Odpowiedź humoralną oceniono przy pomocy tego samego testu, który był stosowany w niniejszej pracy (49). Miarą odpowiedzi komórkowej była proliferacja limfocytów, uwalnianie INF γ pod wpływem antygeny 38-kDa, a także oceniono odpowiedź skórną na antygen 38-kDa zarówno ludzi jak i u świnek morskich. Obserwowano obniżenie odpowiedzi komórkowej na badany antygen u nieleczonych chorych na gruźlicę. Autorzy tłumaczą to zjawisko przesunięciem limfocytów CD4 z obwodu do zmian chorobowych i/lub produkcją cytokin przeciwzapalnych (TGF β) (49). Leczenie przeciwprątkowe prowadziło do

normalizacji produkcji interferonu i odpowiedzi proliferacyjnej na badany antygen (49).

Gruźlica pozapłucna

Statystyki światowe wskazują, że gruźlica pozapłucna (z uwzględnieniem gruźlicy opłucnej) stanowi około 20-30% wszystkich przypadków choroby (1, 4, 105), podczas gdy w Polsce tą postacią choroby rozpoznaje się jedynie u około 5% chorych (2, 6). Zatem można przypuszczać, że duży odsetek tej postaci gruźlicy jest nierozpoznany lub rozpoznany bywa stawiane z opóźnieniem a nawet pośmiertnie (106, 107). Powszechnie uważa się, że przyczyną opóźnionego rozpoznania są trudności diagnostyczne oraz zmniejszająca się wśród lekarzy różnych specjalności świadomość zagrożenia chorobą i wiedza o gruźlicy (65, 107, 108). Objawy kliniczne gruźlicy różnych narządów są bardzo niecharakterystyczne. Bardzo znamienne są wieloletnie wywiady chorobowe i próby różnych sposobów leczenia, zanim postawione zostanie właściwe rozpoznanie (107, 108, 109). Z drugiej zaś strony opóźnienie właściwego leczenia może prowadzić do nieodwracalnego, ciężkiego uszkodzenia zajętych narządów lub nawet do śmierci (106, 110). Nierozpoznana gruźlica narządu ruchu prowadzi do trwałych niekształceń układu kostnego, kalectwa i powikłań neurologicznych (107, 109, 110, 111, 112). Gruźlicze zapalenie opon-mózgowo rdzeniowych stanowi najcięższą postać choroby, wymagającą szybkiego rozpoznania i zastosowania właściwego leczenia. Nieleczona gruźlica ośrodkowego układu nerwowego prowadzi do trwałych porażeń nerwów czaszkowych i jest związana z bardzo wysoką śmiertelnością (113). Nierozpoznana gruźlica układu płciowego u kobiet powoduje niepłodność. Zajęcie układu moczowego przez proces gruźlicy może prowadzić do zniszczenia mięszu nerek i ich niewydolności (41). Gruźlica kory nadnerczy jest jedną z głównych przyczyn choroby Addisona. Rozpoznanie gruźlicy pozapłucnej jest trudne nie tylko ze względu na brak swoistych objawów klinicznych. Istotnym ograniczeniem jest również konieczność zastosowania inwazyjnych metod (biopsje, zabiegi chirurgiczne) celem otrzymania materiału do badań, przy tym badania bakteriologiczne mają niską czułość (32, 113, 115, 116, 118). W niniejszej pracy oceniono odpowiedź humoralną w gruźlicy pozapłucnej oraz porównano do gruźlicy płuc zarówno w aspekcie patogenetycznym jak i diagnostycznym. We wszystkich przypadkach poziomy przeciwciał w gruźlicy pozapłucnej były znamienne wyższe od

grupy kontrolnej. Poziom większości oznaczanych przeciwciał w gruźlicy pozapłucnej był porównywalny lub wyższy od gruźlicy płuc. W świetle analizy odpowiedzi humoralnej w gruźlicy płuc należy przypuszczać, że związane to jest z większą rozległością i obecnością bardziej zaawansowanych postaci choroby w grupie gruźlicy pozapłucnej w porównaniu do gruźlicy płuc. Wyłączając gruźlicę opłucnej i gruźlicę ośrodkowego układu nerwowego, w większości przypadków chorzy reprezentowali późną popierwotną postać choroby o wieloletnim przebiegu. Najliczniejszą grupę chorych na gruźlicę pozapłucną stanowili chorzy na gruźlicę kości i stawów. Uważa się, że proces gruźlicy w narządzie ruchu prawie zawsze patologicznie odpowiada popierwotnej gruźlicy, bez względu czy zakażenie nastąpiło w okresie gruźlicy pierwotnej płuc czy w następstwie rozsiewu krwiopochodnego ze zmian popierwotnych (112). Podobnie jak przypadku gruźlicy płuc, u chorych ze zmianami pozapłucnymi obserwowano dużą rozpiętość otrzymanych wyników. Odzwierciedla to heterogenność badanej grupy. W dostępnym piśmiennictwie znaleziono niewiele prac oceniających odpowiedź humoralną w gruźlicy pozapłucnej (32, 113, 117, 118). Z reguły badane grupy były bardzo nieliczne i bardzo różnorodne pod względem lokalizacji narządowych. Wilkins i Ivanyi wykazali, że średni poziom przeciwciał TB72 (wiążących antygen 38-kDa) jest porównywalny w gruźlicy pozapłucnej i gruźlicy płuc niepotwierdzonej bakteriologicznie, natomiast poziom przeciwciał w gruźlicy płuc potwierdzonej bakteriologicznie był wyższy (32). W badanej przez tych autorów grupie było 64 chorych na gruźlicę pozapłucną, w tym 31 chorych na gruźlicę węzłów chłonnych i 14 chorych na gruźlicę opłucnej, oraz pojedyncze przypadki chorych z późnymi postaciami gruźlicy różnych narządów (32). Inni autorzy porównali poziomy przeciwciał anty-A60 w grupie gruźlicy płuc i pozapłucnej (117). W tym przypadku grupa gruźlicy pozapłucnej była nieliczna (16 osób), a większość stanowili chorzy na gruźlicę obwodowych węzłów chłonnych i gruźlicę opłucnej i jedynie pojedyncze przypadki gruźlicy narządu ruchu i nerek (117). W badanej grupie poziomy przeciwciał były wyższe w gruźlicy płuc niż pozapłucnej (117). Podobnie Malati i wsp. porównali odpowiedź IgG anty A60 w surowicy u chorych na gruźlicze zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych oraz na gruźlicę płuc. W badanej grupie średnie poziomy przeciwciał były znamienne niższe w gruźlicy opon mózgowo-rdzeniowych w porównaniu do gruźlicy kręgosłupa, a także w stosunku do gruźlicy płuc (119). Chierakul i wsp. ocenili odpo-

wiedź IgG anty 38-kDa w surowicy u chorych na gruźlicę opłucnej (120). Zastosowano test immunochromatograficzny. Obecność przeciwciał wykryto u 50% chorych (120). W niniejszej pracy oceniono również odpowiedź humoralną w zależności od zajętego narządu. W klasie IgG średnie miana przeciwciał były najwyższe w najbardziej zaawansowanych postaciach (gruźlica nerek i gruźlica narządu ruchu). Jednak ze względu na małą liczebność badanych podgrup obserwowane różnice nie były istotne statystycznie. Najwyższe poziomy przeciwciał obserwowano w przypadku gruźlicy układu moczowego. Grupa składała się z jedynie 8 przypadków, a obserwowane różnice nie były istotne statystycznie. W gruźlicy opłucnej współistniejącej z gruźlicą płuc poziomy przeciwciał IgG były wyższe niż w przypadku izolowanej gruźlicy opłucnej. Podobne obserwacje w klasie IgG oraz IgA zanotował Gupta (31). W cytowanej pracy średnie poziomy przeciwciał anty A60 były około 4 razy wyższe w gruźlicy zajmującej opłucną i miąższ płucny niż przy izolowanej gruźlicy opłucnej (31). Izolowana gruźlica opłucnej stanowi wczesną postać choroby natomiast gruźlica opłucnej wtórna do zmian w miąższu płucnym reprezentuje proces bardziej zaawansowany i rozległy. Inni autorzy również nie odnotowywali istotnych różnic pomiędzy podgrupami gruźlicy pozapłucnej, podobnie jak w niniejszej pracy podgrupy te były jednak nieliczne (31, 32, 117). Znamienne niższe poziomy w gruźlicy pozapłucnej w stosunku do gruźlicy płuc obserwowano jedynie w klasie IgM i IgA. Obniżone poziomy przeciwciał klasy IgM w gruźlicy pozapłucnej w porównaniu do gruźlicy płuc można tłumaczyć wyższym odsetkiem zaawansowanych postaci gruźlicy oraz dłuższym czasem trwania choroby u chorych na gruźlicę pozapłucną. W przypadku gruźlicy kości i stawów nie obserwowano istotnej różnicy poziomów IgM pomiędzy grupą chorych a kontrolą. Podobnie Gupta i wsp. nie obserwowali różnic w poziomach przeciwciał IgM pomiędzy gruźlicą pozapłucną a grupą kontrolną. Poziom IgM w gruźlicy pozapłucnej był znacząco niższy niż w gruźlicy płuc (31). W badanej grupie chorych na gruźlicę płuc obserwowano korelację poziomów przeciwciał klasy IgG i IgA. W przypadku gruźlicy pozapłucnej poziomy IgA były znamienne obniżone w stosunku do IgG. To ciekawe zjawisko być może należy tłumaczyć brakiem stymulacji pochodzącej ze śluzówek u części chorych na gruźlicę pozapłucną. W badanej grupie dominowali chorzy na gruźlicę narządu ruchu, a więc ognisko chorobowe w tym przypadku nie stykało się ze śluzówkami produkującymi IgA. Znaleziono jedynie 2 publika-

cje oceniające poziom IgA w gruźlicy pozapłucnej. W obu przypadkach dane dotyczyły antygeny A60. Alifano i wsp. w populacji włoskiej zaobserwowali podwyższone poziomy IgA w gruźlicy pozapłucnej w porównaniu do grupy zdrowych oraz chorych z przebytą gruźlicą (117). Nie porównywano wyników do gruźlicy płuc. Autorzy ci zaobserwowali również, że u niektórych chorych na gruźlicę pozapłucną miana przeciwciał były bardzo niskie, bądź nieoznaczalne. Autorzy tłumaczą to zjawisko immunosupresją związaną z wpływem antygenów prątka, choć być może należy to wiązać z czynnikami osobniczymi. Gupta i wsp. w populacji indyjskiej obserwował wyższe poziomy IgA w gruźlicy pozapłucnej w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak znacząco niższe niż w gruźlicy płuc, czy też u osób z przebytą gruźlicą i zmianami nieaktywnymi (31).

Gruźlica u dzieci

Gruźlica u dzieci nadal stanowi poważny problem medyczny w wielu krajach. Każdego roku przybywa około miliona nowych przypadków gruźlicy u dzieci poniżej 15 roku życia a około 450 000 dzieci rocznie umiera z powodu gruźlicy (1, 5). Sytuacja epidemiologiczna w gruźlicy dziecięcej zależy bardzo silnie od stanu epidemiologicznego populacji dorosłych, ponieważ na gruźlicę chorują głównie dzieci zakażone prątkiem przez osobę z najbliższego otoczenia (121). Życiowe ryzyko rozwoju gruźlicy u osoby dorosłej zakażonej wynosi około 5-10%, natomiast u niemowląt około 50%, u dzieci w wieku 1-5 lat -24% a u nastolatków – 15% (122). W krajach o dobrej i średniej sytuacji epidemiologicznej od wielu już lat zapadalność na gruźlicę u dzieci systematycznie zmniejsza się. W Polsce w ostatnich latach notuje się jedynie około 100-200 przypadków rocznie w skali całego kraju (2, 6). W Stanach Zjednoczonych co roku odnotowuje się jedynie około 1000 zachorowań (123). Niewielki procentowo udział dzieci w globalnej liczbie chorych sprawia, że gruźlica u dzieci nie stanowi priorytetu dla organizacji i programów walki z gruźlicą. Drugim istotnym powodem jest fakt, że dzieci bardzo rzadko stanowią źródło zakażenia gdyż najczęściej nie prątkują, a więc nie zakażają otoczenia. Sytuacja globalna skłania jednak do poszukiwania metod zwalczania gruźlicy u dzieci, w tym wiarygodnych metod rozpoznawania i leczenia nowych przypadków. Pomimo rozwoju metod diagnostycznych, bardzo często gruźlicę u dzieci rozpoznaje się podobnie jak 100 lat temu na podstawie wywiadu

epidemiologicznego, próby tuberkulinowej, badania bakteriologicznego popłuczyn żołądkowych, zdjęcia klatki piersiowej (39, 122). Gruźlica dziecięca jest skąpoprątkowa, w Polsce jedynie 25% przypadków gruźlicy u dzieci uzyskuje potwierdzenie mikrobiologiczne (39, 121). Gruźlica u dzieci bardzo często przebiega bezobjawowo lub objawy kliniczne są bardzo dyskretne (39, 65). Dzieci, zwłaszcza najmłodsze, nie wykrztuszają płwociny, stąd konieczne jest wykonywanie inwazyjnych badań: pobrania popłuczyn żołądkowych lub popłuczyn z drzewa oskrzelowego. Posiew popłuczyn żołądkowych ma ograniczoną wartość diagnostyczną. Czulość hodowli z tego materiału u dzieci zwykle nie przekracza 25% (124). Ocenia się także, że 25-35% wszystkich przypadków gruźlicy u dzieci to gruźlica pozapłucna (122). Najnowocześniejsze metody rozpoznawania gruźlicy oparte na metodach molekularnych mają również ograniczoną przydatność. Czulość badania PCR u dzieci jest również stosunkowo niska (około 40%), swoistość około 80% (125). Przyczyną istotnych trudności w rozpoznawaniu gruźlicy dziecięcej jest odmienny przebieg i obraz kliniczny niż u dorosłych. Zwykle w przebiegu zakażenia prątkiem rozróżnia się 3 fazy: ekspozycję, utajone zakażenie oraz aktywną gruźlicę. U dzieci przejście pomiędzy poszczególnymi fazami jest płynne i trudne do uchwycenia. Co więcej choroba u dzieci ma tendencje do samoograniczenia. Z tego powodu rozróżnienie pomiędzy zakażeniem a chorobą jest arbitralne a granica zależy od dostępnych metod diagnostycznych i jest w pewnym sensie umowna. Z drugiej jednak strony rozróżnienie pomiędzy zakażeniem a aktywną gruźlicą jest bardzo ważne w aspekcie postępowania medycznego. Dzieci zakażone poddane są profilaktycznej monoterapii izoniazidem, dzieci chore otrzymują pełne leczenie. Zatem prawidłowa kwalifikacja do odpowiedniej grupy jest ważna ze względu na prawdopodobieństwo powstania oporności na leki w następstwie monoterapii. W krajach rozwiniętych prowadzi to do nadrozpoznawalności choroby, ponieważ dobra tolerancja skłania do wczesnego włączenia leczenia. Zarówno przebieg jak i obraz kliniczny w gruźlicy dziecięcej odbiegają od gruźlicy u dorosłych. Gruźlica u dzieci to głównie gruźlica pierwotna węzłowa, węzłowo-płucna lub postać rozsiana. W naszej populacji gruźlica pierwotna u dzieci występuje rzadko i praktycznie nigdy poniżej 10 roku życia (39). W niniejszej pracy oceniono odpowiedź humoralną na antygeny prątka w grupie dzieci chorych na gruźlicę oraz przeprowadzono analizę czynników wpływających na produkcję przeciwciał. Porównano poziomy przeciw-

ciał przeciwpłatkowych w grupie dzieci z gruźlicą pierwotną węzłową, dzieci z gruźlicą płuc (zarówno pierwotną jak i popierwotną), u dzieci zakażonych prątkiem oraz grupą kontrolną dzieci zdrowych lub chorych na inne niż gruźlica choroby układu oddechowego. Mimo statystycznie częstszego niż u dorosłych występowania gruźlicy pozapłucnej u dzieci, w badanym materiale znalazły się jedynie pojedyncze przypadki. Pomimo wieloletnich kontaktów z czołowymi ośrodkami w kraju zajmującymi się gruźlicą dziecięcą nie udało się zebrać większej grupy chorych. Ze względu na globalnie małą ilość zachorowań na gruźlicę u dzieci w Polsce, liczba przypadków gruźlicy pozapłucnej u dzieci jest bardzo niewielka. Dla całej grupy dzieci chorych na gruźlicę średnie poziomy przeciwciał IgG i IgA w gruźlicy były znamienne wyższe od grupy kontrolnej. Na podwyższony średni poziom rzutowały wysokie miana przeciwciał w pojedynczych przypadkach, podczas gdy miana przeciwciał u większości dzieci były bardzo niskie. Wysokie poziomy przeciwciał w większości wypadków dotyczyły dzieci z zaawansowanymi zmianami typu dorosłych (gruźlica popierwotna). W gruźlicy pierwotnej, zarówno węzłowej jak i węzłowo-płucnej, obserwowano jedynie pojedyncze wysokie wartości. Średnie poziomy przeciwciał w gruźlicy ograniczonej do węzłów chłonnych były znamienne niższe od gruźlicy płuc we wszystkich przypadkach, za wyjątkiem IgM, i były istotnie wyższe od kontroli jedynie w klasie IgG anty 38+16-kDa. Przyczyna bardzo niskich poziomów przeciwciał przeciwpłatkowych może wynikać z przewagi wczesnych i ograniczonych postaci gruźlicy u dzieci (126). Ze względu również na brak jednoznacznych kryteriów rozpoznawania gruźlicy u dzieci należy także wziąć pod uwagę nadrozpozniwalność tej choroby. Na podstawie analizy wyników w grupie dorosłych wykazano, że zmiany wczesne i o ograniczonej rozległości współistnieją z bardzo słabą odpowiedzią humoralną. Drugim możliwym wyjaśnieniem niskich poziomów przeciwciał w grupie dzieci jest ich niezdolność do odpowiedzi na badane antygeny prątka, szczególnie w młodszym wieku. Słabo nasiloną odpowiedzią humoralną na antygeny prątka u dzieci chorych na gruźlicę była potwierdzona przez innych autorów (126, 127, 128). W badanej grupie, podobnie jak w grupie dorosłych, średnie poziomy przeciwciał IgM w grupie chorych na gruźlicę, zakażonych prątkiem oraz w grupie kontrolnej nie różniły się między sobą. Podobnie jak u dorosłych zjawisko to można tłumaczyć wpływem czynników środowiskowych (szczepienia BCG oraz kontakt z mykobakteriami ze środowiska). Beyazova i wsp. wyka-

zali, że poziom IgM anty A60 u dzieci nieszczepionych BCG jest bardzo niski, ale obserwuje się jego postępujący wzrost w ciągu kilkunastu miesięcy po szczepieniu (88). Badania były przeprowadzone w Turcji. Natomiast badania poziomu IgM anty-A60 przeprowadzone w Indiach nie potwierdziły wpływu szczepień BCG na poziom przeciwciał (127). Nie obserwowano różnic poziomów IgM pomiędzy grupą dzieci szczepionych i nieszczepionych (127). Można to zapewne tłumaczyć wpływem mykobakterii ze środowiska. Należy pamiętać, że mikroflora Indii bardzo różni się od europejskiej. Uważa się, że im klimat jest gorętszy, tym większa obfitość mykobakterii w środowisku. Indie są krajem gdzie występuje także zakażenie trądem. Mikroflora środowiska mogła być przyczyną całkowitej nieskuteczności szczepionki BCG w zapobieganiu gruźlicy w Indiach. U niemowląt szczepienie BCG stymulowało produkcję IgG poprzedzoną spadkiem miana tych przeciwciał. Przejściowe obniżenie tłumaczono zanikiem przeciwciał matczynych (88). Delacourt i wsp. obserwowali istotną różnicę poziomów IgG i IgM anty A60 u dzieci francuskich szczepionych BCG w porównaniu do nieszczepionych (128). Autorzy ci ocenili również odpowiedź humoralną u dzieci zakażonych prątkiem. Grupa ta różniła się statystycznie od grupy kontrolnej jedynie w przypadku przeciwciał klasy IgA. Być może czynnikiem indukującym IgA jest kontakt antygenów prątka z organizmem zakażonego dziecka poprzez błonę śluzową dróg oddechowych, jakkolwiek hipotezie tej przeczy stosunkowo słabo nasiloną odpowiedzią humoralną w tej klasie przeciwciał u dzieci. Doniesienia innych autorów są sprzeczne. Jedni autorzy nie obserwowali wpływu zakażenia prątkiem na poziom przeciwciał (128). Inni badacze wykazali, że poziomy wszystkich klas przeciwciał były podwyższone w grupie dzieci szczepionych BCG ze styczności z osobą chorą (126). W badanej grupie nie stwierdzono różnicy w odpowiedzi humoralnej w grupie dzieci zakażonych prątkiem w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie obserwowano również korelacji pomiędzy poziomem przeciwciał klasy IgG i IgA przeciwie do grupy dorosłych. Podobnie Imaz i wsp. nie obserwowali korelacji pomiędzy poziomem IgG i IgA (126). Analizując wpływ wieku dziecka na odpowiedź humoralną oceniono średni poziom przeciwciał w 4 podgrupach wiekowych: 0-1 rok życia, 2-5 lat, 6-9 lat oraz w grupie 10-18 lat. Zbadano również korelację pomiędzy wiekiem dziecka a poziomem przeciwciał oraz przeprowadzono analizę jednowymiarową czynników wpływających na odpowiedź humoralną wszystkich dzieci łącznie oraz z podziałem na pod-

grupy poniżej i powyżej 10 roku życia. W badanej grupie żadne dziecko poniżej 4 roku życia, nawet w przypadku ciężkiej rozsianej postaci gruźlicy, nie odpowiadało na antygeny prątka. W dwóch najmłodszych grupach wiekowych wartości średnie miana przeciwciał w grupie gruźlicy i grupie kontrolnej nie różniły się. W przypadku przeciwciał klasy IgA nie obserwowano różnic pomiędzy grupą gruźlicy a grupą kontrolną w żadnej z badanych grup wiekowych. Dla klasy IgM również nie obserwowano żadnych prawidłowości, co więcej, w najmłodszej i najstarszej grupie średni poziom przeciwciał IgM w grupie kontrolnej nieznamienne przewyższył średni poziom IgM u chorych na gruźlicę. Poziomy przeciwciał klasy IgG u dzieci chorych na gruźlicę znamienne przewyższały kontrolę jedynie w najstarszej grupie wiekowej (A60 oraz 38-kDa) lub w dwóch najstarszych grupach dla 38 + 16-kDa oraz 38-kDa + LAM. Dla wszystkich badanych testów obserwowano znamienne dodatnią korelację (przeciwnie niż u dorosłych) pomiędzy poziomem przeciwciał a wiekiem dziecka. Podobny wpływ wieku na odpowiedź humoralną obserwowali inni autorzy (128). W badaniu Delacourt wyniki powyżej poziomu odcięcia występowały jedynie u dzieci powyżej 5 roku życia (128). Według Delacourt wiek dziecka również silnie wpływał na poziom przeciwciał IgG. Autorzy ci zauważyli również, że poziomy IgM były bardzo rozproszone (128). Natomiast Imaz i wsp. obserwowali dodatnią korelację pomiędzy wiekiem dziecka a IgM zarówno w grupie gruźlicy jak i w grupie kontrolnej (126).

Podobnie jak w grupie dorosłych, u dzieci przeprowadzono analizę czynników wpływających na produkcję przeciwciał. Różnice pomiędzy poziomem przeciwciał w gruźlicy pierwotnej i popierwotnej były obserwowane we wszystkich przypadkach klasy IgG. Podobne zależności są potwierdzone przez innych autorów (126, 127, 128). Nie obserwowano różnic w odpowiedzi humoralnej w różnych postaciach gruźlicy zarówno w przypadku klasy IgA jak i IgM. Obserwację tę również potwierdził Delacourt (128). Przeciwnie niż u dorosłych, poziomy wszystkich badanych przeciwciał były wyższe u dziewczynek niż u chłopców, choć obserwowane różnice nie były istotne statystycznie. Brak różnic w odpowiedzi immunologicznej u obu płci przed okresem dojrzewania, a nawet nieznacznie wyższą zapadalność na gruźlicę u dziewczynek, potwierdzili też inni autorzy (126). Obecność jamy była czynnikiem istotnie wpływającym na poziom przeciwciał IgG anty 38 + 16-kDa oraz IgA. Obecność prątkowania nieznamienne zwiększała

produkcję przeciwciał wszystkich klas. Zjawisko to, które można tłumaczyć podobnie jak u dorosłych związkiem między produkcją przeciwciał a intensywnością stymulacji antygenowej, było też obserwowane przez innych autorów (127, 128). W niniejszej pracy nie potwierdzono zależności pomiędzy IgM a żadnym czynnikiem związanym z przebiegiem choroby zarówno w grupie dzieci jak i u dorosłych. Podobnie brak wpływu jakiegokolwiek czynnika związanego z przebiegiem choroby na poziom IgM potwierdził Delacourt w populacji francuskiej (128). Natomiast w populacji indyjskiej obserwowano wyższe poziomy IgM w gruźlicy pierwotnej w porównaniu do popierwotnej (127). Zjawisko to autorzy tłumaczą kinetyką produkcji IgM. Ta klasa przeciwciał jest produkowana we wczesnych okresach pierwotnej odpowiedzi na antygen prątka i ulega deplecji w postępującej chorobie popierwotnej (127).

Ze względu na odrębności w przebiegu gruźlicy u młodszych i starszych dzieci dokonano analizy z podziałem na 2 podgrupy wiekowe: poniżej i powyżej 10 roku życia. W grupie dzieci młodszych jedynym czynnikiem modyfikującym produkcję przeciwciał była obecność prątkowania wpływająca na wysokość miana przeciwciał IgG anty A60, oraz obecność rozpadu w badaniu radiologicznym dla klasy IgG anty 38-kDa + LAM. W grupie starszej obecność prątkowania korelowała znamienne ze wzrostem IgG anty A60. Natomiast obecność jamy wpływała na produkcję przeciwciał we wszystkich przypadkach przeciwciał IgG. Nie obserwowano wpływu płci na odpowiedź humoralną w żadnej podgrupie wiekowej. Nie odnotowano również różnic pomiędzy podgrupami chorych z odmiennymi postaciami gruźlicy. Zjawisko to było być może związane z małą liczebnością poszczególnych podgrup, przy znaczącym rozproszeniu wyników.

Przeciwnie niż w grupie dorosłych, wielkość odczynu tuberkulinowego nie korelowała z odpowiedzią humoralną u dzieci. Podobne obserwacje zanotowali inni autorzy (88, 128). Zjawisko to może być związane ze znacznie słabszym antagonizmem pomiędzy komponentami Th1 i Th2 u dzieci w porównaniu do dorosłych (114). Stosunkowo niska zapadalność na gruźlicę u dzieci jest pewnym paradoksem, jeśli powiąże się wrażliwość na zachorowanie ze stanem układu odpornościowego oraz ze skłonnością do odpowiedzi typu Th2. Wykazano, że ludzkie komórki dendrytyczne pochodzące z krwi pępowinowej prezentują głęboki defekt produkcji IL12, która jest główną cytokiną uruchamiającą produkcję INF γ oraz polaryzację w kierunku Th1 (114). Zatem u noworodków istnieje przewaga

odpowiedzi typu Th2 (114). Szczepienie noworodków BCG jest czynnikiem silnie stymulującym odpowiedź immunologiczną typu Th1 (114). BCG jest czynnikiem silnie aktywującym komórki APC i odpowiedź komórkową, jakkolwiek stymuluje również odpowiedź humoralną na wiele antygenów. Ota i wsp. wykazali, że BCG znacząco pobudza odpowiedź immunologiczną zarówno komórkową jak i humoralną na antygeny wirusa zapalenia wątroby typu B, a także pobudza produkcję zarówno cytokin typu Th1 (INF γ) jak i Th2 (IL5, IL13), oraz aktywuje zarówno limfocyty T jak i B (114). Za jeden z głównych kanonów odpowiedzi Th1/Th2 uważano teorię o ich przeciwstawności oraz wzajemnym hamowaniu swojego różnicowania i funkcji (21). Jednak BCG promuje obie odpowiedzi. Przyczyną może być zjawisko suboptymalnej kostymulacji komórek dendrytycznych, które uruchamiają odpowiedź Th1 poprzez IL12, co prowadzi do równoległej syntezy obu podtypów cytokin (114). Zatem u dzieci odpowiedź humoralna i komórkowa na antygeny prątka nie posiada nasilonych cech przeciwstawności jak u dorosłych, co może tłumaczyć brak ujemnej zależności pomiędzy wynikiem odczynu tuberkulinowego a poziomem przeciwciał przeciwaprątkowych.

Wartość diagnostyczna testów serologicznych.

Rozpoznanie gruźlicy, mimo że należy ona do najczęstszych chorób zakaźnych, nie jest łatwe. Diagnoza opiera się na objawach kliniczno-radiologicznych, metodach mikrobiologicznych (klasycznych i nowoczesnych), technikach molekularnych, badaniu histopatologicznym i odczynie tuberkulinowym (36). Objawy kliniczno-radiologiczne są niespecyficzne. Obraz kliniczny może odpowiadać różnym chorobom jak między innymi: nowotwory, inne zakażenia układu oddechowego, grzybice, zapalenia naczyń, sarkoidoza. Gruźlica coraz częściej przebiega w sposób zamaskowany lub atypowy, szczególnie u chorych z zaburzeniami odporności. Złotym standardem w rozpoznaniu gruźlicy są metody mikrobiologiczne (36). Badanie bezpośrednie rozmazu płwociny jest szybką i tanią metodą, ale mało czułą. Konieczna jest obecność prątków w badanym materiale w liczbie co najmniej 10⁴/ml (36). Metoda ta nie umożliwia także różnicowania pomiędzy poszczególnymi gatunkami prątka. Badanie bezpośrednie niezwykle rzadko jest pomocne w rozpoznaniu gruźlicy pozapłucnej, gdyż płyny ustrojowe lub biopaty zajętych narządów na ogół nie zawierają odpowiednio dużej liczby

bakterii. Hodowla prątków jest wiarygodną metodą diagnostyczną, choć wadą tej metody jest jej czasochłonność. Posiew metodą klasyczną na podłożu Löwensteina-Jensena trwa 6-8 tygodni, nowoczesne odmiany technik hodowlanych pozwalają na skrócenie czasu do 10-14 dni, lecz są bardzo kosztowne i wymagające specjalistycznego sprzętu (36). Metody oparte na technikach molekularnych również wymagają specjalistycznego oprzyrządowania i są drogie (130). Wykrycie DNA prątków nie pozwala na różnicowanie żywych i martwych prątków. Wyniki fałszywie dodatnie można obserwować u osób zdrowych zakażonych oraz u osób wyleczonych, bądź ze zmianami nieaktywnymi (131). Pomimo zastosowania nowoczesnych metod diagnostycznych w Polsce nadal u około 50% chorych na gruźlicę nie udaje się uzyskać potwierdzenia bakteriologicznego (6, 132).

Ocena swoistej odpowiedzi humoralnej jest powszechnie stosowana w rozpoznaniu wielu chorób zakaźnych. Metody serologiczne są wiarygodną metodą potwierdzenia rozpoznania w przypadku, gdy hodowla drobnoustroju jest trudna (wirusy, w tym HIV, mykoplazmy, chlamydia). Od kilkadziesiąt lat próbuje się opracować test serologiczny pomocny w rozpoznawaniu gruźlicy. Mimo intensywnych badań nadal nie określono miejsca i roli serodiagnostyki w rozpoznawaniu różnych postaci gruźlicy. Jednym z celów niniejszej pracy była próba oceny przydatności testów serologicznych do rozpoznawania różnych postaci gruźlicy w populacji polskiej. Badane testy służyły do wykrywania przeciwciał przeciwko pojedynczym antygenom prątka (38-kDa i A60) lub były złożone z dwóch różnych antygenów (38-kDa i 16-kDa lub 38-kDa i lipoarabinomannan). W przypadku antygenów 38-kDa + LAM przebadano odpowiedź immunologiczną we wszystkich trzech klasach przeciwciał (IgG, IgA i IgM). Pozostałe testy bazowały jedynie na klasie IgG. Na podstawie analizy ROC wykazano, że przydatność w diagnostyce gruźlicy w naszej populacji wykazują jedynie testy wykrywające przeciwciała klasy IgG anty 38-kDa. Pole pod krzywą ROC jest miarą dokładności testu. W przypadku idealnego testu diagnostycznego pole pod krzywą jest bliskie 1. W przypadku zupełnej nieprzydatności danej cechy do różnicowania dwóch przeciwstawnych populacji, pole pod krzywą wynosi 0,5. Dla klasy IgG wyliczono następujące wartości pola pod krzywą: 0,81 (38-kDa), 0,79 (38 +16-kDa) oraz 0,76 (38-kDa +LAM). Pole pod krzywą ROC było niskie dla klasy IgM oraz IgA. W takim przypadku nie można wyznaczyć poziomu odcięcia oddzielającego grupę chorych na daną chorobę od grupy

osób bez tej choroby. Zatem przydatność testów IgA i IgM do rozpoznawania gruźlicy w naszej populacji jest bardzo ograniczona. Dla wszystkich testów obliczono również czułość, swoistość oraz wartość predykcji dodatniej i ujemnej. Obliczenia przeprowadzono dla wszystkich przypadków gruźlicy u dorosłych łącznie oraz dla wybranych podgrup gruźlicy płuc i pozapłucnej. Osobno oceniono przydatność diagnostyczną badanych testów u dzieci. Najlepszą charakterystykę we wszystkich analizowanych grupach posiadały testy oparte na antygenach rekombinowanych. Czუłość obu testów w wykrywaniu gruźlicy u dorosłych wynosiła około 50% przy swoistości 98%. Czუłość obu testów była zatem zbliżona do czułości innych metod służących do potwierdzenia gruźlicy (w tym badań mikrobiologicznych). Wyniki otrzymane przez innych autorów są porównywalne lub wyższe w zależności od populacji badanej i od rodzaju antygeny. Najlepiej przebadane, o największym znaczeniu diagnostycznym, są testy wykrywające przeciwciała IgG (32, 42, 52, 65). Sada i wsp. opracowali test ELISA wykrywający przeciwciała klasy IgG anty-LAM i ocenili jego czułość na 75%, a swoistość na 92% (40, 61). LAM indukuje silną odpowiedź humoralną u chorych na gruźlicę i jest bardzo silnym stymulatorem dla produkcji TNF α . Uważa się, że LAM odgrywa ważną rolę w patogenezie choroby (86). Chiang i wsp. porównali odpowiedź na różne antygeny prątkowe (133). Autorzy ci wykazali, że testy wykorzystujące A60 mają większą czułość (81%) w porównaniu z testami opartymi na antygenie 38 kDa i Kp90 jednakże przy obniżonej swoistości (88%) (133). Przyczyną wyższej czułości testów serologicznych opisanych przez innych autorów są prawdopodobnie różnice populacyjne. Większość badań serologicznych przeprowadzono w krajach azjatyckich (Indie, Chiny) bądź Ameryki Południowej. W krajach tych zapadalność na gruźlicę jest znacznie wyższa niż w Polsce a także znacznie częściej stwierdza się ciężkie, rozległe zaawansowane postacie choroby. Badania przeprowadzone w Europie Zachodniej również często dotyczą grup imigrantów z krajów o wysokiej zapadalności. Kolejną przyczyną różnic czułości badanych testów może być selekcja przypadków gruźlicy. Na ogół autorzy prac wybierają jedynie chorych z gruźlicą potwierdzoną bakteriologicznie, odrzucając tym samym grupę chorych z niewielkimi, mało zaawansowanymi zmianami, u których produkcja przeciwciał jest obniżona. Ważne jest również, że typ odpowiedzi humoralnej i jej nasilenie zależą od fazy choroby. Znaczące poziomy przeciwciał pojawiają się najczęściej u chorych, u których choroba

trwa ponad 3 miesiące (65). W czasie leczenia miano przeciwciał rośnie przez 1-2 miesiące a potem spada, ale jest wykrywane przez 1-2 lat (42, 65). U osób z przebytą gruźlicą, ze starymi wygojonymi zmianami poziomy przeciwciał są porównywalne z poziomami u osób zdrowych (9). Bezobjawowe zakażenie pierwotne oraz zmiany minimalne również nie indukują wystarczającej odpowiedzi humoralnej (12). Ta wielka różnorodność czynników wpływających na odpowiedź humoralną może być przyczyną znacznej rozpiętości wyników otrzymanych przez różnych autorów.

W niniejszej pracy potwierdzono wysoką swoistość testów opartych na antygenach rekombinowanych. W przypadku obu testów w grupie kontrolnej u ponad 200 osób obserwowano jedynie 4 wyniki fałszywie dodatnie. W tym 3 przypadki dotyczyły chorych na sarkoidozę. Podwyższone poziomy przeciwciał przeciwprątkowych u chorych na sarkoidozę były również odnotowywane przez innych autorów. Istnieją 2 możliwe hipotezy wyjaśniające to zjawisko. Potencjalną przyczyną może być poliklonalna hipergammaglobulinemia i nieswoiste pobudzenie produkcji przeciwciał o różnorodnej specyficzności, w tym również przeciwciał przeciwprątkowych. Podwyższone poziomy przeciwciał przeciwko antygenom prątka mogą być spowodowane nieswoistą aktywacją układu limfocytów przez pobudzone w toku procesu chorobowego pomocnicze limfocyty T oraz spontanicznie produkowane cytokiny (153). Innym możliwym wytłumaczeniem jest hipoteza łącząca etiologię sarkoidozy, lub przynajmniej niektóre jej przypadki, z zakażeniem prątkami (134). Podobieństwo cech klinicznych, histologicznych i immunologicznych gruźlicy i sarkoidozy pozwalało poszukiwać zbliżonej etiologii (134). Doniesienia na temat obecności materiału prątka w zmianach sarkoidalnych były niejednoznaczne. Ziarniniaki są typową odpowiedzią tkanek na trudno usuwalne cząstki (na przykład związki berylu, krzemu, prątki, grzyby, pierwotniaki, pyły organiczne). Liczne doniesienia o identyfikacji antygenów prątków w zmienionych chorobowo narządach lub we krwi chorych na sarkoidozę nie zostały jednak potwierdzone (135). Pozostaje nierozstrzygnięte czy reakcja ziarniniakowa w sarkoidozie jest spowodowana zakażeniem mykobakteryjnym czy zbieżność tych zmian ze sporadycznym wykryciem w nich fragmentów DNA prątków jest tylko przypadkowa (135). Swoistość testów opartych na LAM i A60 była znacznie niższa. Wysokie poziomy przeciwciał przeciwko niespecyficznym antygenom prątka u osób bez gruźlicy mogą być wywołane reakcją krzyżową

z antygenami prątków ze środowiska, szczepieniami BCG oraz zakażeniem prątkami gruźlicy bez cech choroby. Zjawiska te były dyskutowane powyżej.

Większość testów serologicznych służących do wykrywania gruźlicy bazuje na przeciwciałach klasy IgG, jakkolwiek opracowano również testy oparte na przeciwciałach klasy IgA i IgM (31). Sugerowano, że łączna ocena 2-3 klas immunoglobulin może zwiększyć czułość testów. Sugerowano również, że IgM mogą być przydatne do wykrywania wczesnych postaci gruźlicy, w tym gruźlicy u dzieci, gdyż produkcja przeciwciał klasy IgM jest związana z pierwotną odpowiedzią humoralną (31). W badanej populacji test oparty na klasie IgM odznaczał się bardzo niską czułością oraz bardzo niską wartością predykcji dodatniej i ujemnej. Świadczy to o tym, że przydatność tego testu do wykrywania gruźlicy jest znikoma. Wartość predykcji dodatniej i ujemnej bardzo dobrze charakteryzuje test diagnostyczny, gdyż zależy również od wielkości badanej populacji. Wartość predykcji dodatniej informuje o prawdopodobieństwie istnienia choroby u osoby, u której wynik testu wypada dodatnio. Najwyższe wartości predykcji dodatniej posiadają testy oparte na antygenach rekombinowanych (96%). W praktyce oznacza to, iż dodatni wynik testu z wysokim prawdopodobieństwem świadczy o istnieniu choroby. W przypadku dodatniego wyniku testu, szczególnie przy wysokim mianie przeciwciał, z dużym prawdopodobieństwem można rozpoznać gruźlicę, jednakże zawsze w powiązaniu z obrazem kliniczno-radiologicznym. Na ogół, do czasu otrzymania dodatnich wyników badań mikrobiologicznych, rozpoznanie gruźlicy opiera się na ocenie prawdopodobieństwa występowania choroby. U chorych, u których nie uzyskuje się potwierdzenia mikrobiologicznego, dodatni wynik testów serologicznych byłby ważnym argumentem za wdrożeniem leczenia przeciwprątkowego. Wartość predykcji ujemnej wszystkich badanych testów była stosunkowo niska, więc przydatność ujemnego wyniku testu do wykluczenia choroby jest znikoma. Przydatność testów serologicznych oceniono łącznie dla wszystkich chorych na gruźlicę oraz w wybranych postaciach gruźlicy. W grupie gruźlicy płuc u dorosłych czułość testów była porównywalna do całej grupy gruźlicy. Czulość testów oceniono również w grupie chorych prątkujących i nieprątkujących oraz w grupie nowych przypadków, chroników i chorych ze wznową. Najwyższą czułość wszystkich badanych testów, za wyjątkiem testu IgM, osiągnięto u chorych prątkujących, w stosunku do nieprątkujących oraz u chroników w porównaniu

do nowych przypadków (154). W grupie chorych ze wznową czułość była nieco wyższa niż w nowych przypadkach, ale niższa niż u chroników. Wyższą czułość u chorych z bardziej rozległym procesem chorobowym oraz u chorych prątkujących potwierdzili inni autorzy (31, 128). W przypadku przeciwciał klasy IgM w grupie chroników czułość była bardzo niska (jedynie 15%). W pozostałych podgrupach wynosiła średnio około 30% z wyjątkiem chorych ze wznową (23%). W niniejszej pracy nie wykazano szczególnej przydatności testów opartych na przeciwciałach klasy IgA. Czulość testu opartego na IgA była porównywalna lub niższa niż testu IgG, natomiast swoistość znacznie obniżona. Sugerowano, że łączna ocena obu klas przeciwciał zwiększa czułość testów. W niniejszej pracy nie potwierdzono tej obserwacji. Być może na obniżenie swoistości klasy IgA wpłynął również rodzaj antygeny (LAM). Ze względu na szerokie rozpowszechnienie tego antygeny, testy oparte na LAM mogą wypadać dodatnio także u osób bez gruźlicy. Uma Devi i wsp. przebadali przydatność testu opartego na antygenie 38-kDa we wszystkich 3 klasach przeciwciał. Czulość testu w klasie IgG wynosiła 61% natomiast w klasie IgA i IgM odpowiednio 30% i 10%. Badania przeprowadzono w populacji indyjskiej. Test oparty na IgM miał bardzo niską czułość (10%) oraz niską swoistość (87%) (84). Gupta i wsp. ocenili przydatność testu opartego na antygenie A60 we wszystkich 3 klasach przeciwciał. Czulość przeciwciał klasy IgM w gruźlicy płuc wynosiła 41%, natomiast klasy IgA – 88,4% a dla IgG – 98,3%. Badania były przeprowadzone w populacji indyjskiej (31). Swoistość badanych testów wynosiła 90% dla IgM, 93% dla IgG i 94% dla IgA (31). Znacznie niższą czułość autorzy ci obserwowali w izolowanej gruźlicy opłucnej: 56% (IgA) oraz 72% (IgG) (31).

W gruźlicy pozapłucnej u dorosłych czułość wszystkich testów była nieznacznie niższa niż w gruźlicy płuc. Należy jednak zaznaczyć, że grupa gruźlicy pozapłucnej była bardzo heterogenna. Obejmowała zarówno wczesne przypadki choroby (gruźlica opłucnej, ośrodkowego układu nerwowego) jak i późne, zaawansowane (gruźlica nerek, kości). Szczególnie wysokie miana przeciwciał obserwowaliśmy w gruźlicy popierwotnej (gruźlica kości i stawów, gruźlica nerek). Wy tłumaczeniem tego zjawiska może być fakt, iż w tych postaciach gruźlicy stymulacja antygenowa jest długotrwała, a w organizmie znajduje się duży ładunek antygenowy. Przeciwnie zjawisko obserwowaliśmy w gruźlicy węzłów chłonnych (gruźlica pierwotna). W tych przypadkach poziomy IgG i IgA były niskie

(porównywalne z grupą kontrolną) natomiast podwyższone były poziomy przeciwciał IgM, co jest charakterystyczne dla pierwotnej odpowiedzi humoralnej na antygen. Czulość testu IgM w gruźlicy pozapłucnej była bardzo niska. Jednakże podgrupy gruźlicy pozapłucnej były bardzo nieliczne a więc otrzymane wyniki mogą być traktowane jako przybliżone. Porównywalne wyniki dotyczące klasy IgM stwierdzili inni autorzy (128).

W badanej grupie czulość badań serologicznych zależała od rodzaju antygeny, klasy przeciwciał i zajętego przez proces gruźliczy narządu. Łącznie u wszystkich chorych na gruźlicę pozapłucną i dla wszystkich badanych antygenów poziomy przeciwciał były podwyższone w klasie IgG. Czulość testu IgG anty 38kDa i 16kDa w wykrywaniu gruźlicy pozapłucnej wynosiła 63% a więc przewyższała inne metody diagnostyczne. Podobne do naszych wyniki uzyskali inni autorzy. Wilkins i Ivanyi wykazali, że odsetek dodatnich wyników testu serologicznego z użyciem antygeny 38kDa u chorych na gruźlicę pozapłucną wynosił 70-80% niezależnie od zajętego narządu. Autorzy ci opisali test ELISA oparty o antygen TB72 38-kDa o wysokiej czulości i swoistości (32). Autorzy wykryli przeciwciała przeciwko antygenowi 38-kDa w 73% przypadków przy swoistości 98%. W badanej grupie 64 chorych na gruźlicę pozapłucną było tylko 10 chorych na gruźlicę narządu ruchu. W tej grupie 7 osób miało wykrywalne przeciwciała anty 38kDa. Stroebel i wsp. stwierdzili, że 15 spośród 16 chorych z czynną gruźlicą kości i stawów prezentowało wysokie miano przeciwciał przeciwko antygenowi 6 w porównaniu do osób zdrowych i z nieaktywną formą choroby. Przy wybranym poziomie odcięcia czulość testu wyniosła 94%, swoistość 100% (136). Alifano i wsp. wykryli IgG anty A60 u 73,8% chorych na gruźlicę pozapłucną (117). W badaniach Zou i wsp. czulość testu IgG antyA60 u 92 z gruźlicą pozapłucną wynosiła 69-86% (137). W obu powyższych badaniach podgrupy chorych na gruźlicę pozapłucną były nieliczne. Opisana w niniejszej pracy grupa chorych na gruźlicę pozapłucną jest największą grupą opisaną w światowym piśmiennictwie (138).

W grupie dzieci czulość testów, za wyjątkiem klasy IgM, była znacznie niższa niż w grupie dorosłych. Swoistość testów była porównywalna. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy (126, 128). Znacznie wyższą czulość opisali inni autorzy w populacji dzieci w Indiach (127). Wartość predykcji dodatniej i ujemnej były również znacznie obniżone, co wskazuje na znikomą przydatność badanych testów do rozpoznawania i do wykluczenia gruźlicy u dzieci. Szczególnie niską czulość

stwierdzono w grupie dzieci poniżej 10 roku życia a także w gruźlicy pierwotnej niezależnie od wieku. Czulość testów w gruźlicy popierwotnej u dzieci i nastolatków była zbliżona do dorosłych. Najwyższą czulość, przeciwnie niż u dorosłych, prezentował test IgM, jednak i w tym przypadku czulość wahała się od 50% w grupie powyżej 10 roku życia do około 30% w pozostałych analizowanych podgrupach. Czulość klasy IgA była bardzo niska, poniżej 15% w gruźlicy popierwotnej. Bardzo słaba odpowiedź humoralna u dzieci była odnotowywana przez innych autorów (126). Imaz i wsp. badając test oparty na antygenie 16-kDa obliczyli czulość 34% dla IgG, 19% dla IgA oraz jedynie 3% dla IgM. Jedynie badania przeprowadzone w Indiach wykazywały wyższą czulość jednakże przy obniżonej swoistości (127). Najwyższą czulość osiągnął test oparty na klasie IgM 49% przy swoistości 97%, IgA 32% przy swoistości 98% oraz IgG 34% przy swoistości 96%. Poziomy odcięcia za wyjątkiem IgM były niższe niż w naszej populacji (127). Obniżona swoistość testów w populacji indyjskiej mogła być związana z ekspozycją na prątki saprofityczne w środowisku. Inni autorzy także potwierdzili nieprzydatność testu bazującego na klasie IgM ze względu na nakładanie się wyników w grupie kontrolnej i badanej (128). W badanej grupie krzywa ROC nie pozwoliła na dobranie odpowiedniego poziomu odcięcia. Czulość testów silnie zależała od wieku dzieci. W grupie poniżej 10 lat wynosiła zaledwie 8% – jedynie pojedyncze przypadki powyżej poziomu odcięcia. Średnie poziomy przeciwciał w gruźlicy dziecięcej były podwyższone w stosunku do kontroli, jednak przy podziale na grupy wiekowe stwierdzono, że statystycznie istotna różnica pomiędzy chorymi a grupą kontrolną dotyczy jedynie dzieci powyżej 10 lat. Jest to bardzo ciekawe zjawisko immunologiczne. Powszechnie uważa się, że dzieci rozpoczynają produkcję przeciwciał w pierwszych latach życia. Niejasne więc pozostaje, czy i dla czego w przypadku antygenów prątka dojrzałość immunologiczną osiąga się znacznie później.

Oceniając przydatność nowych testów diagnostycznych w gruźlicy dziecięcej należy brać pod uwagę podstawowe różnice patofizjologiczne pomiędzy gruźlicą u dorosłych i u dzieci. U dzieci świeżo zakażonych prątkiem aktywne podziały i wzrost prątków w organizmie zachodzą pomimo braku objawów klinicznych i radiologicznych. U pewnego odsetka dzieci można wyhodować prątki gruźlicy z popłuczyn żołądkowych pomimo braku klinicznych i radiologicznych cech choroby. Dlatego wyniki niektórych badań mikrobiologicznych mogą wypadać dodatnio w grupie dzieci włączanej

do grupy zakażonych prątkiem. Podobnie nadmierną czułość mogą wykazywać badania genetyczne. Być może nawet, w związku z rozwojem nowych metod diagnostycznych, będzie trzeba zmienić definicję zakażenia i choroby. Oceniając przydatność badania PCR do rozpoznawania gruźlicy u dzieci, DNA prątka wykryto w 83% próbek klinicznych, podczas gdy w badaniu bezpośrednim jedynie u 21%, a metodą hodowli u 42% dzieci (139). U 39% dzieci w badanej grupie stwierdzano żadnych klinicznych ani radiologicznych cech choroby (139). Te wyniki jeszcze raz demonstrują arbitralność podziału pomiędzy zakażeniem a gruźlicą u dzieci. Badanie PCR ma ograniczone zastosowanie w wykrywaniu gruźlicy u dzieci. Wynik negatywny nie wyklucza choroby, pozytywny jej nie potwierdza. Czułość hodowli u dzieci wynosi jedynie 40%, czułość wywiadu epidemiologicznego 70% (123). Zatem istnieje niebezpieczeństwo nad i niedodiagnozowania gruźlicy u dzieci.

Powszechnie dyskutuje się potencjalną przydatność testów serologicznych w rozpoznawaniu gruźlicy. Z jednej strony istnieje ogromna potrzeba opracowania prostej, taniej i wiarygodnej metody diagnostycznej, możliwej do szerokiego zastosowania w krajach biednych. Szeroko prowadzone badania przeważnie potwierdzają wysoką swoistość i akceptowalną czułość tych testów. Nadal jednak metody serologiczne mają liczne przeciwników. Bardzo interesująca hipoteza głosi, że podobnie jak u chorych na trąd, istnieje polaryzacja kliniczna gruźlicy na postać rozsianą związaną z odpowiedzią humoralną, oraz postać ograniczoną z silną odpowiedzią komórkową. Sugeruje się również, że postać korelująca z silną odpowiedzią humoralną była letalna dla rasy ludzkiej, w związku z tym doszło do naturalnej selekcji osobników skłonnych raczej do odpowiedzi typu komórkowego. Autorzy tej hipotezy wnioskujeją zatem, że czułość testów serologicznych nigdy nie przekroczy 60-70% gdyż wyselekcjonowana rasa ludzka w większości przypadków utraciła zdolność do produkcji przeciwciał w odpowiedzi na antygeny prątka. Wyniki niniejszej pracy tylko częściowo potwierdziły tę teorię. Bardzo prawdopodobne wydaje się natomiast, że gruźlicę należy traktować jako wynik ciągłego procesu pomiędzy zakażeniem a zachorowaniem. Odpowiedź humoralna może pojawić się jedynie w pewnej fazie tego procesu a większość chorych w chwili badania może znajdować się poza nią. Ważny jest również fakt, że wiarygodny test serologiczny jest najbardziej potrzebny w tych przypadkach, w których akurat odznacza się najniższą czułością (wczesne fazy choroby, chorzy nieprą-

kujący, niewielkie zmiany). Ze względu jednak na trudności diagnostyczne w wielu przypadkach gruźlicy, testy serologiczne mogą mieć znaczenie wspomagające, przy umiejętnej interpretacji otrzymanych wyników.

Testy immunochromatograficzne

Testy immunochromatograficzne to proste testy paskowe. Dużym walorem tego typu testów jest łatwość wykonania, nawet bez żadnego zaplecza laboratoryjnego, niska cena i krótki czas oczekiwania na wynik. Z tego powodu testy paskowe mogłyby być pomocne jako szybkie testy przesiewowe u osób z podejrzeniem gruźlicy (151). Bardzo niewiele jest prac oceniających przydatność testów paskowych opartych na metodzie immunochromatograficznej (120, 140, 141, 142). Podstawowym ograniczeniem tego typu testów jest ich niska czułość. W badanej grupie test był dodatni u 51% chorych na gruźlicę. Czułość badanego testu była nieznacznie niższa niż w przypadku testu ELISA, przy znacznej zgodności otrzymanych wyników. Pewne rozbieżności pomiędzy testem immunoenzymatycznym a immunochromatograficznym opartym na tym samym antygenie i wykrywającym przeciwciała tej samej klasy należy tłumaczyć względami technicznymi. Test ELISA wymaga długotrwałych inkubacji badanego materiału z antygenem opłaszczonym w fazie stałej. Test paskowy polega natomiast na szybkim przepływie nierozcieńczonej surowicy przez pasek bibuły. Krótkotrwałość kontaktu antygen – przeciwciała umożliwia jedynie powstanie wiązań o wysokim powinowactwie. Z jednej strony może to być przyczyną nieznacznie obniżonej czułości niż w stosunku do testu ELISA, z drugiej jednak strony metoda ta utrudnia to niespecyficzne wiązanie innych przeciwciał nieswoistych dla danego antygeny. Umożliwia to również zastosowanie nierozcieńczonej surowicy (89). Podobnie jak w przypadku testów ELISA, czułość była wyższa u chorych prątkujących i u chronicznych. Jednakże główne zastosowanie testów paskowych powinno prowadzić do rozpoznania gruźlicy w nowych przypadkach i u chorych nieprątkujących. W tych grupach chorych czułość badanego testu była znacznie niższa (35% i 25%). Podobnie w gruźlicy u dzieci czułość testu Rapid wynosiła jedynie 27%. Prawdopodobnie poziom odcięcia badanego testu został ustalony na zbyt wysokim poziomie w stosunku do poziomów przeciwciał przeciwpłątkowych u dzieci. Jedynie u dzieci starszych, chorych na gruźlicę płuc typu dorosłych, test Rapid prezentował stosunkowo

wysoką czułość (64%). Test ten może być zatem stosowany jako wspomagający rozpoznanie tej postaci choroby. Potwierdzono także wyższy odsetek dodatnich wyników w grupie chorych prątkujących w chwili badania. Wynika to prawdopodobnie z obecności w organizmie dużej liczby prątków, co silniej stymuluje odpowiedź humoralną. Niskie poziomy przeciwciał przeciwko antygenowi 38 kDa u części chorych na gruźlicę mogą być spowodowane słabą stymulacją antygenową, co było dyskutowane powyżej. Test paskowy jest testem półilościowym i jest obciążony błędem związanym z oceną wzrokową. Chierakul i wsp. przebadali przydatność testu immunochromatograficznego opartego na antygenie 38-kDa w rozpoznawaniu gruźlicy płucnej (120). Czułość testu oceniono na 50,7 % przy swoistości 57,7 % (120). Niską swoistość autorzy wiążą z wysokim odsetkiem osób zakażonych prątkiem gruźlicy w populacji Tajlandii. Cole i wsp. ocenili czułość testu paskowego opartego na antygenie 38-kDa na 89% u chorych prątkujących i 74% u chorych nieprątkujących. Swoistość testu w badanej grupie wynosiła 93%. Badania przeprowadzono w populacji chińskiej (89). McConkey i wsp. ocenili przydatność szybkiego testu immunochromatograficznego do rozpoznawania gruźlicy w 2 populacjach o różnej zapadalności na gruźlicę: populacji egipskiej w porównaniu do populacji z St. Louis w USA. Czułość testu w populacji egipskiej wynosiła 87%, natomiast w USA wynosiła 29% (143). Można zatem wnioskować, że test immunochromatyczny może być prostą i tanią alternatywą dla testu ELISA, przy uwzględnieniu ograniczeń testu immunoenzymatycznego (150).

Ocena odpowiedzi humoralnej w BALF oraz płynie opłucnowym, osierdziowym i mózgowo-rdzeniowym.

Zmiany chorobowe w przebiegu gruźlicy mają najczęściej charakter ograniczonego zapalenia zlokalizowanego w jednym bądź w niewielkiej liczbie narządów. Postacie rozsiane stanowią znikomy odsetek wszystkich przypadków choroby. Ze względu na ograniczony charakter zmian chorobowych, procesy immunologiczne zachodzące lokalnie mogą nie odzwierciedlać się systemowo. Innym powszechnie znanym zjawiskiem w przebiegu reakcji ziarniniakowej jest kompartmentalizacja odpowiedzi immunologicznej z przesunięciem i aktywacją komórek układu odpornościowego w miejscu zapalenia (104). Zjawisko to jest najsilniej wyrażone w przypadku sarkoidozy, ale dotyczy również wielu innych chorób ziarniniakowych, w tym gruźlicy

(104). Przesunięcie aktywowanych komórek immunokompetentnych z krwi obwodowej do miejsca przebiegu reakcji zapalnej może tłumaczyć brak skórnej reakcji na tuberkulinę w niektórych przypadkach gruźlicy. Wykazano również, że u części chorych na gruźlicę, poziom przeciwciał przeciwko antygenom prątka w surowicy jest bardzo niski. W niniejszej pracy oceniono lokalną odpowiedź humoralną w płynach ustrojowych oraz popłuczynach pochodzących z narządów zajętych procesem gruźliczym. Stosowane w pracy testy zostały opracowane oraz dostosowane do oceny poziomu przeciwciał w surowicach. W wielu jednak przypadkach poziom przeciwciał w surowicy u chorych z ograniczonymi zmianami jest niski. W tych sytuacjach przeciwciał można poszukiwać w płynach ustrojowych pochodzących z zajętego przez proces gruźliczy narządu. Celem oceny lokalnej odpowiedzi humoralnej w układzie oddechowym zbadano poziom przeciwciał w BALF. Wyniki porównano wykorzystując 3 różne rozcieńczenia tego materiału, celem wyboru optymalnych warunków przeprowadzenia badania. Analiza uzyskanych wyników wskazuje, że optymalnym rozcieńczeniem BALF jest rozcieńczenie 1:10, a więc 5 lub 10 raz niższe niż w przypadku surowicy. Jedynie w przypadku takiego rozcieńczenia BALF uzyskiwano optymalne różnice pomiędzy grupą badaną a kontrolą. Dla wszystkich badanych przeciwciał przy rozcieńczeniu 1:1 różnica pomiędzy grupą kontrolną a badaną była niewielka. W wielu próbkach pochodzących od chorych z grupy kontrolnej obserwowano bardzo wysokie wyniki gęstości optycznej. Związane to było najprawdopodobniej z obecnością wysokiej interferencji tła spowodowanej reakcją antygen-przeciwciała o niespecyficznym charakterze przy zbyt dużym zagęszczeniu próbki. Rozcieńczenia wskazane dla surowic były za wysokie w stosunku do poziomu przeciwciał w próbce. Zarówno w grupie kontrolnej jak i w grupie badanej poziomy przeciwciał były bardzo niskie i nie różniły się między sobą. W przypadku optymalnego rozcieńczenia próbek, różnica pomiędzy grupą gruźlicy a grupą kontrolną była znamieną statystycznie w przypadku wszystkich badanych klas przeciwciał z wyjątkiem IgM. Podobnie podwyższony poziom przeciwciał przeciwprątkowych w BALF u chorych na gruźlicę zaobserwowali inni autorzy (69, 144). Grubek –Jaworska i wsp. badali poziom przeciwciał klasy IgG anty A60 w BALF (69). Autorzy ci nie stwierdzili istotnych różnic w grupie chorych na gruźlicę, sarkoidozę, raka płuca oraz u osób zdrowych, jednakże badane grupy były bardzo nieliczne. Grupa chorych na gruźlicę składała się z 13 osób, wszystkie pozostałe grupy liczyły

10 lub mniej osób. Autorzy ci również nie rozcieńczyli BALF, co mogło być powodem zawyżonych wyników w grupie kontrolnej. Znamienne różnice obserwowano natomiast w przypadku poziomów przeciwciał w surowicy u tych samych chorych, przy rozcieńczeniu surowic w stosunku 1:100 (69). Raja i wsp. obserwowali w BALF podniesiony poziom przeciwciał IgG przeciwko antygenowi 5, którego głównym składnikiem jest antygen 38-kDa. Podwyższony poziom był obserwowany również w przypadku klasy IgA, choć wzrost poziomu IgA był niższy niż klasy IgG. BALF był nierozcieńczony (144). Podobne zależności obserwowano w niniejszej pracy.

Oceniono również poziom przeciwciał przeciwprątkowych w płynie opłucnowym, osierdziowym i mózgowo-rdzeniowym u chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy kontrolnej. Gruźlica osierdzia jest bardzo trudna do rozpoznania. Jest to postać choroby zagrażająca życiu, a jej następstwem może być ciężkie późne powikłanie pod postacią zaciskającego zapalenia osierdzia (145). Diagnoza opiera się na posiewie płynu osierdziowego, biopsji osierdzia, oraz rozpoznaniu współistniejącej gruźlicy innych narządów. Choroba jest bardzo rzadka a grupy opisane w piśmiennictwie bardzo nieliczne. Trautner i wsp. poddała analizie 10 przypadków gruźlicy osierdzia. Z tej grupy u 6 chorych wyhodowano prątki, jednak u 5 z nich dodatni wynik hodowli otrzymany był dopiero po zakończeniu hospitalizacji (145). Rozpoznanie gruźliczego zapalenia opon jest trudne niezależnie od stosowanych metod diagnostycznych. Czulość metod bakteriologicznych w przypadku posiewu płynu mózgowo-rdzeniowego jest bardzo niska (113, 129). Trudności diagnostyczne może również sprawiać izolowana gruźlica opłucnej, gdyż odsetek bakteriologicznych potwierdzeń tej postaci choroby jest znacznie niższy niż w przypadku gruźlicy płuc. Oceniając poziom przeciwciał przeciwprątkowych w płynie osierdziowym i opłucnowym nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupą chorych na gruźlicę a grupą kontrolną w przypadku żadnej z badanych klas przeciwciał. Znamienne różnice uzyskano jedynie dla przeciwciał klasy IgG w przypadku gruźlicy opon mózgowo-rdzeniowych. Uzyskane wyniki należy jednak traktować jako pilotowe gdyż badane grupy były nieliczne. W dostępnym piśmiennictwie znaleziono niewiele prac oceniających lokalną odpowiedź humoralną u chorych na gruźlicę obejmującą błony surowicze. Chierakul i wsp. porównali przydatność testu immunochromatograficznego opartego na antygenie 38-kDa w rozpoznawaniu gruźlicy opłucnej. Test wykonano zarówno w surowicy jak i w

płynie opłucnowym. Poziomy przeciwciał w surowicy korelowały z lokalną odpowiedzią humoralną u większości chorych, jednak w kilku przypadkach poziom przeciwciał był podwyższony w płynie opłucnowym, natomiast niski w surowicy. Autorzy sugerują, że przynajmniej w części przypadków lokalna synteza przeciwciał i ich sekrecja do płynu opłucnowego może mieć miejsce (120). Levy i wsp. porównali poziomy przeciwciał w surowicy i w płynie opłucnowym. Autorzy ci wykazali, że po przeliczeniu na poziom białka, miano IgG przeciwko mieszaninie antygenów prątka koreluje z ich poziomem w surowicy. Uzyskane wyniki sugerują raczej bierne przechodzenie IgG z surowicy do płynu opłucnowego a nie miejscową produkcję (146). Watt i wsp. ocenili poziom przeciwciał przeciwprątkowych w płynie mózgowo-rdzeniowym w populacji egipskiej (147). Obecność przeciwciał wykryto u 52% chorych na gruźlicę, przy swoistości 96% (147). Malati i wsp. w populacji indyjskiej wykazali wyższy średni poziom przeciwciał IgG anty A60 w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych na gruźlicę w porównaniu do grupy chorych na niegruźlicze zakażenia (119). Oceniając przydatność badanego testu do rozpoznawania gruźlicy wyliczono dodatnią wartość predykcijną na poziomie 83% przy niskiej swoistości (63%) oraz ujemnej wartości predykcyjnej wynoszącej 25%. Badany test był zatem mało przydatny do rozpoznawania gruźlicy. (119). Bothamley i wsp. badali potencjał serologiczny antygeny 19-kDa w płynie mózgowo-rdzeniowym w populacji europejskiej i indyjskiej. Autorzy ci wykazali, że oceniany test różnicuje grupę chorych od zdrowych w populacji europejskiej natomiast nie różnicuje w populacji indyjskiej (148). Podniesiony poziom INF γ i IL2 w płynie osierdziowym u chorych na gruźlicę osierdzia w stosunku do nieswoistych zakażeń i do nowotworów wskazuje na istnienie lokalnej odpowiedzi typu Th1 u tych chorych (149). W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono prac oceniających odpowiedź humoralną na antygeny prątka w płynie osierdziowym.

Podsumowanie

Układ odpornościowy pełni wiodącą rolę w patogenezie gruźlicy. Objawy kliniczne, natura i nasilenie choroby zależą od indywidualnego charakteru odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Pomimo ogromnego postępu w rozumieniu mechanizmów odpornościowych w gruźlicy zależności pomiędzy zjawiskiem odporności, nadwrażliwości i obecnością martwicy są ciągle niejasne. Bar-

dzo charakterystycznym i unikalnym zjawiskiem w przebiegu gruźlicy jest ogromny polimorfizm odpowiedzi immunologicznej zależny od wielu czynników demograficznych, środowiskowych a także indywidualnych i związanych z fazą choroby. Ta ogromna różnorodność jest najprawdopodobniej przyczyną ogromnych rozbieżności w ocenie i interpretacji zjawisk immunologicznych oraz ich implikacji praktycznych prowadzących do opracowania skutecznej szczepionki czy też działań immunoterapeutycznych w gruźlicy. Heterogenność odpowiedzi immunologicznej w gruźlicy narzuca konieczność oceny dużych grup chorych w celu odkrycia uniwersalnych prawidłowości a wyciągane wnioski pozwala raczej odnosić do skali populacyjnej, a nie indywidualnej. Bardzo charakterystycznym zjawiskiem jest również pewna dwoistość wielu mechanizmów immunologicznych i ich podwójna korzystna i niekorzystna rola zarazem. Przez wiele lat przyjmowano, że jedynym mechanizmem obronnym w gruźlicy jest odpowiedź komórkowa natomiast towarzysząca jej odpowiedź

humoralna nie odgrywa żadnej roli w patogenezie choroby. Wydaje się jednak, że podział czynników i mechanizmów immunologicznych na obronne i destrukcyjne oraz skuteczne i nieskuteczne jest zbyt uproszczony. Dowiodła tego mała skuteczność prób manipulowania odpowiedzią immunologiczną w celu kontroli zachorowań.

Powszechnie znane trudności diagnostyczne skłaniają także do poszukiwania nowych metod rozpoznawania gruźlicy. Wartościowe metody powinny być odpowiednio czułe swoiste a także tanie, proste, o krótkim czasie oczekiwania na wynik. Nadal wiele nadziei pokłada się w udoskonalonych testach serologicznych. Obecnie dostępne techniki serologiczne z całą pewnością nie mogą zastąpić metod mikrobiologicznych, ale mogą być ich uzupełnieniem w niektórych postaciach gruźlicy. Nadal trwają szeroko zakrojone intensywne badania budowy antygenowej prątka i próby wyizolowania nowych antygenów, które mogłyby stać się bazą dla udoskonalonych testów serologicznych w przyszłości.

Wnioski

I. Odpowiedź humoralna na antygeny prątka u chorych na gruźlicę.

1. U chorych na gruźlicę obserwuje się pobudzenie odpowiedzi humoralnej na antygeny prątka. Odpowiedź humoralna jest heterogenna i zależy od czynników osobniczych, związanych z przebiegiem choroby, a także od rodzaju antygeny i klasy przeciwciał. Najsilniejszą współzależność z parametrami klinicznymi wykazuje odpowiedź humoralna w klasie IgG przeciwko antygenom rekombinowanym swoistym dla *Tuberculosis complex*.
2. Odpowiedź humoralna w gruźlicy jest bardziej nasiloną w zaawansowanych postaciach choroby. Czynnikiem najsilniej wpływającym na odpowiedź humoralną na antygeny prątka jest rozległość zmian chorobowych. Innymi czynnikami wpływającymi na wytwarzanie przeciwciał są: postać kliniczna i przebieg choroby, obecność prątkowania i jam. Wczesne i mało zaawansowane zmiany są związane ze słabą odpowiedzią humoralną.
3. U dorosłych istnieje ujemna korelacja między wynikiem odczynu tuberkulinowego a mianem przeciwciał przeciwprątkowych.
4. Odpowiedź humoralna na antygeny prątka u dzieci jest znacznie słabsza niż u dorosłych. Zależy ona od wieku dziecka i jest bardzo słaba lub nieistniejąca u dzieci poniżej 10 roku życia. Wytwarzanie przeciwciał przeciwprątkowych u dzieci zależy od postaci choroby i jest słabiej nasiloną w postaci węzłowej niż w węzłowo-płucnej. Odpowiedź humoralna w gruźlicy popierwotnej u dzieci przebiega podobnie do odpowiedzi u osób dorosłych.
5. Poziomy przeciwciał u dorosłych chorych na gruźlicę pozapłucną są porównywalne lub wyższe niż w gruźlicy płuc i zależą od postaci gruźlicy pozapłucnej.
6. Poziomy przeciwciał przeciwprątkowych w BALF oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym są podwyższone u chorych na gruźlicę płuc i ośrodkowego układu nerwowego

7. Poziomy przeciwciał klasy IgG i IgA korelują ze sobą, poziom przeciwciał klasy IgM na ogół zachowuje się przeciwnie w stosunku do obu klas immunoglobulin. Na poziom przeciwciał IgM, zarówno u dorosłych jak i u dzieci, nie wpływa żaden czynnik związany z przebiegiem choroby.

II. Wartość diagnostyczna badanych testów.

8. Badane testy serologiczne zarówno immunoenzymatyczne jak i immunochromatograficzne mogą stanowić metodę uzupełniającą w rozpoznawaniu niektórych postaci gruźlicy. Testy paskowe mogą stanowić alternatywę dla testów ELISA w gruźlicy płuc i pozapłucnej u dorosłych. Testy serologiczne są mało przydatne w rozpoznawaniu gruźlicy u dzieci poniżej 10 roku życia, natomiast mogą być pomocne w rozpoznawaniu gruźlicy u nastolatków.
9. Najlepszą wartością diagnostyczną w naszej populacji posiadają testy utworzone na bazie antygenów rekombinowanych (38kDa i 16kDa) oceniające poziom przeciwciał klasy IgG. Testy oparte na przeciwciałach klasy IgA mają niższą czułość niż testy oparte na klasie IgG. Łączna ocena obu klas przeciwciał może zwiększyć czułość testów kosztem ich swoistości. Testy oparte na przeciwciałach IgM mają bardzo niską czułość i swoistość.

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/XXX/LII/5-6: 26-29
3. Zwolska Z.: Tuberculosis in the world and in Poland at the 20th century. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences, Biological Sciences* 1996; 44: 261-71
4. Ziment I.: Epidemiology of mycobacterial infection today. *Eur. Respir. Rev.* 1995; 5: 91-7
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. Young D. B., Garbe T. R. Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1991; 59: 3086-3096
8. Bassey E.O. i wsp.: T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* 1996; 77: 146-53
9. Tan J.S., Canaday D.H., Boom H. i wsp.: Human alveolar T lymphocyte responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *J. Immunol.* 1997; 159: 290-97
10. Lai C.K.W., Sheng H., Chan C.H.S. i wsp.: Cytokine gene expression profile of circulating CD4+ T cells in active pulmonary tuberculosis. *Chest* 1997; 111: 606-11
11. Harrington III J.J., Ho J.L., Lapa e Silva J.R. i wsp.: *Mycobacterium tuberculosis* lipid antigens: use of multi-antigen based enzyme immunoassay for free and complex dissociated antibodies. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2000; 4: 161-167
12. Havlir D., Wallis R.S., Boom H. i wsp.: Human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Infect. Immun.* 1991; 59: 665-70
13. Falla J.C., Parra C. A., Mendoza M. i wsp.: Identification of B and T-cell epitopes within the MPT40 protein of *Mycobacterium tuberculosis* and their correlation with the disease course. *Infect Immun.* 1991; 5: 2265-2273
14. Bassey E.O. i wsp.: Candidate antigens for improved serodiagnosis of tuberculosis. *Tubercle*, 1996; 77:136-145
15. Coates A.R.M., Hewitt J., Allen B.W. i wsp.: Antigenic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies. *Lancet* 1981; 2, 167-69
16. Ilangumaran S., Shanker Narayan N.P., Ramu G., Muthukaruppan V.R.: Cellular and humoral immune responses to recombinant 65-kD antigen of *Mycobacterium leprae* in leprosy patients and healthy controls. *Clin. Exp. Immunol.* 1994; 96: 79-85
17. Tsukaguchi K., Balaji K.N., Boom H.W.: CD4+ $\alpha\beta$ T cell and $\gamma\delta$ T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 1995; 154: 1786-96
18. Havlir D., Wallis R.S., Boom H. i wsp.: Human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *Infect. Immun.* 1991, 59, 665-70
19. Rook G.A.W., Seah G., Ustianowski A.: M. tuberculosis: immunology and vaccination. *Eur. Respir. J.* 2001; 17, 537-557
20. Follows G.A., Munk M.E., Gatrill A.L., Conradt P., Kaufmann S.H.: Gamma interferon and interleukin 2, but not interleukin 4, are detectable in $\gamma\delta$ T-cell cultures after activation with bacteria. *Infect. Immun.* 1992; 60: 1229-31
21. Hernandez-Pando R., Orozco H., Sampieri A. i wsp.: Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996; 89: 26-33
22. Biron Ch.A., Gazzinelli R.T.: Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. *Current Opin. Immunol* 1995; 7: 485-96
23. Costello A. M. L., Kumar A., Narayan V. i wsp.: Does antibody to mycobacterial antigens, including lipoarabinomannan, limit dissemination in childhood tuberculosis? *Proc. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1992; 86: 686-692
24. Teitelbaum R., Glatman-Freedman A., Chen B. i wsp.: A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15688-15693
25. Amicosante M., Paone G., Ameglio F. i wsp.: Antibody repertoire against the A60 antigen complex during the course of pulmonary tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 1993; 6: 816-822
26. Ellner J.J.: Review: the immune response in human tuberculosis – implications for tuberculosis control. *J. Infect. Dis* 1997; 176, 1351-1359
27. Copper A., Flynn J. L.: The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Opin. Immunol.* 1995; 7: 512-16
28. Johnson N M, McNichol M W, Burton-Kei E J i wsp.: Circulating immune complexes in tuberculosis. *Thorax* 1981; 36: 610-617
29. Johnson C.M., Cooper A.M., Frank A.A. I wsp.: *Mycobacterium tuberculosis* aerogenic rechallenge infections in B cell-deficient mice. *Tuberc Lung Dis* 1997; 78: 257-261
30. Glatman-Freedman A., Casadevall A.: Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11: 514-532
31. Gupta S., Kumari S., Banwalikar J.N., Gupta S.K.: Diagnostic utility of the estimation of mycobacterial antigen A60 specific immunoglobulins IgM, IgA and IgG in the sera of cases of adult human tuberculosis. *Tubercle Lung Dis.* 1995; 76: 418-424
32. Ferreira P., Soares R., Arala-Chaves M.: Susceptibility to infection with *Mycobacterium avium* is paradoxically correlated with increased synthesis of specific anti-bacterial antibodies. *International Immunol.* 1991; 3: 445-452
33. Vordermeier H. M., Venkataprasad N., Harris D. P. i wsp.: Increase of tuberculosis infection in the organs of B cell-deficient mice. *Clin. Exp. Immunol.* 1996; 106: 312-316
34. Ivanyi J., Thole J. Specificity and function of T and B-cell recognition in tuberculosis. *W Bloom B. R. Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control.* Washington: ASM Press, 1994; 437-458
35. Andersen A.B., Brennan P.: Proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *w Bloom B. R. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control.* Washington: ASM Press, 1994; 307-332
36. Grange J.M.: Diagnostic tests for tuberculosis and their evaluation. *Sem. Respir. Infect.* 1994; 9: 71-77
37. Wilkins E.G., Ivanyi J.: Potential value of serology for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Lancet* 1990; 336: 641-44
38. Julian E., Matas L., Hernandez A., Alcaide J., Luquin M.: Evaluation of a new serodiagnostic tuberculosis test based on immunoglobulin A detection against Kp-90 antigen. *Int. J. Tubercle Lung Dis.* 2000; 4: 1082-1085
39. Ceglecka-Tomaszewska K., Ziolkowski J.: Gruźlica u dzieci – 12 letnie obserwacje. *Klinika* 1993; 2, 26-27
40. Sada E., Aguilar D., Torres M. i wsp.: Detection of lipoarabinomannan as a diagnostic test for tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30, 2415-18
41. Smith M.H., Weistein A.J.: Genitourinary tuberculosis, red. Schlossberg D.: Tuberculosis. Springer Verlag. NY 1994; 155-65

42. Daniel T.M., Debanne S.M.: The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 135, 1137-51
43. Arloing S. Agglutination de bacille de la tuberculose vraie. *Comptes Rendues de l'Academie de Sciences* 1898; 126: 1398-1400
44. Rowińska E., Halweg H.: Zastosowanie przesączów hodowli różnych szczepów prątków dla wykrycia precypityn w surowicy u ludzi chorych na gruźlicę. *Gruźlica* 1968; 3, 401-08
45. Rowińska E., Halweg H.: Kliniczne znaczenie obecności precypityn przeciwprątkowych w surowicy krwi u chorych. *Gruźlica* 1971; 39, 387-97
46. Jacket P.S., Bothamley G.H., Batra H. i wsp.: Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26, 2313-18
47. Nagai S., Wiker H.G., Harboe M. i wsp.: Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1991; 59, 372-82
48. Daniel T.M., Anderson P.A.: The isolation by immunoabsorbent affinity chromatography and physicochemical characterisation of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1978; 117, 533-39
49. Wilkinson R.J., Haslov K., Rappuoli R. i wsp.: Evaluation of the recombinant 38-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* as a potential immunodiagnostic reagent. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35, 553-57
50. Alifano M., de Pascalis R., Sofia M. i wsp.: Evaluation of IgA-mediated humoral immune response against the mycobacterial antigen P-90 in diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest* 1997; 111, 601-05
51. Harboe M., Wiker H.G.: The 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. *J. Infect. Dis.* 1992; 166: 874-884
52. Kadival G.V., Chaparas S.D., Hussong D.: Characterization of serologic and cell-mediated reactivity of a 38-kDa antigen isolated from *M. tuberculosis*. *J. Immunol* 1987, 139, 2447-51.
53. Bassey E.O.: T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle* 1996, 77, 146-53
54. Verbon A., Hartskeerl R., Schuitema A. i wsp.: The 14,000-molecular-weight antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is related to the alpha-crystalline family of low molecular weight heat shock proteins. *J. Bacteriol.* 1992; 174: 1352-1359
55. Demkow U., Zielonka T.M., Filewska M., i wsp.: IgG mediated immune response against mycobacterial antigen 38-kDa and 16-kDa in extrapulmonary tuberculosis. *Allergy. Clin. Immun. Intern.* 2000; suppl.2: 209
56. Pottumarthy S., Wells V.C., Morris A.J.: A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. *J.Clin. Microbiol.* 2000; 38: 2227-2231
57. Bruneteau M., Perret J., Vanlinden F., Michel G., Cocito C.: Composition and immunogenicity of polysaccharide components of the thermostable macromolecular antigen group of mycobacterial antigens. *Med. Microbiol. Immunol.* 1992; 181, 13-17
58. Cocito C., Vanlinden F.: Preparation and properties of antigen 60 from *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin. Exp. Immunol.* 1986; 66, 262
59. Coetsier C., Baelden M.M., Coene M., Cocito C.: Immunological analysis of the components of the antigen complex A60 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1994; 1, 139-144
60. Cocito C.: Properties of mycobacterial antigen complex A60 and its applications to the diagnosis and prognosis of tuberculosis. *Chest* 1991; 100, 1687-1695
61. Sada E. i wsp.: Detecton of lipoarabinomannan as a diagnostic test for tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30: 2415-18
62. Alifano M., Matteo S., Mormile M. i wsp.: IgA immune response against the mycobacterial antigen A60 in patients with active pulmonary tuberculosis. *Respiration* 1996; 63, 292-97
64. Abou-Zeid C., Harboe M., Sundsten B., Cocito C.: Cross-reactivity of antigens from the cytoplasm and cell-walls of some corynebacteria and mycobacteria. *J. Infect. Dis.* 1985; 151, 170-179
65. Daniel T.M.: Immunodiagnosis of tuberculosis, red. Rom W.N., Garay S.M.: Tuberculosis. Little, Brown and Comp. Boston 1996; 223-31
66. Ilangumaran S., Shanker Narayan N.P., Ramu G. i wsp.: Cellular and humoral immune response to recombinant 65-kD antigen of *Mycobacterium leprae* in leprosy patients and healthy controls. *Clin. Exp. Immunol.* 1994; 96, 79-85
67. Wilkinson R.J., Haslov K., Rappuoli R. i wsp.: Evaluation of the recombinant 38-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* as a potential immunodiagnostic reagent. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35, 553-57
68. Kaczmarek A., Hałasa J., Kamiński M., Nowak M., Bugaj J.: Występowanie przeciwciał przeciwprątkowych wykrywanych metodą immunofluorescencji pośredniej u chorych na gruźlicę płuc i kontrolne u ludzi zdrowych. *Pneum. Alergol. Pol.* 1991; 59: 40-43
69. Grubek-Jaworska H., Zwolska Z., Droszcz P., Rybus L., Dąbrowski A., Droszcz W.: Serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) IgG against A60 and 38 kDa (ELISA assays) in diagnosis of tuberculosis. *Int. J. Tuberc Lung Dis.* 1997; 1: 556-562
70. Siemińska A., Wolska-Goszka L., Słomiński J. M.: Oznaczanie stężenia przeciwciał IgG przeciw antygenowi A60 mykobakterii w diagnostyce różnicowej guza płuca. *Pol. Merk. Lek.* 2000; 8: 31-33
71. Bassey E.O., Life P.F., Catty D., Gaston J.S., Kumararatne D.S.: T-cell response to mycobacterial proteins: a comparative study of tuberculosis and control immunoblots of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* BCG. *Tubercle Lung Dis.* 1996; 77: 146-53
72. Ravn P., Boesen H., Pedersen B.K., Andersen P.: Human T cell response induced by vaccination with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin. *J. Immunol.* 1997; 158: 1949-55
73. Pitchappan R.M., Bahmajothi V., Rajaram K. i wsp.: Spectrum of immune reactivity to mycobacterial (BCG) antigens in healthy hospital contact in South India. *Tubercle* 1991; 72: 133-139
74. Maes R. Incidence of inapparent active mycobacterial infections in France detected by an IgG serological test based on antigen 60. *Med. Microbiol. Immunol.* 1989; 25, 579- 585
75. Sharma O.P., Alam S.: Diagnosis, pathogenesis, and treatment of sarcoidosis. *Current Opinion Pulmonary Med.* 1995; 1, 392-400
76. Rowińska-Zakrzewska E.: Mikobakteriozy, red. Rowińska-Zakrzewska E., Kuś J.: Choroby układu oddechowego. Wyd. II. PZWL, Warszawa 1997
77. S-PLUS 2000 User's Guide, Data Analysis Products Division, MathSoft, Seattle, WA, Seattle, 1999
78. Bronner W.S., Newman T.B., Cummings S.R.: Designing a new study: III. Diagnostic tests. w Hulley S.B., Cummings S.R. Designing clinical research. Baltimore, Williams and Wilkins 1988; 89-92
79. Altman D.G., Bland J.M.: Statistics notes: Diagnostic tests 3: receiver operating characteristic plots. *Br. Med. J.* 1994; 309: 188-189
80. Brett S.J., Ivanyi J.: Genetic influences on the immune repertoire following tuberculous infection in mice. *Immunology* 1990; 71: 113-119

81. Boom W.H., Canaday D.H., Fulton S.A. i wsp.: Human immunity to *M. tuberculosis*: T-cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis* 2003; 83: 98-106.
82. Surcel H.-M., Troye-Blomberg M., Paulie S. i wsp.: Th1/Th2 profiles in tuberculosis based on proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. *Immunology* 1994; 81: 171-176
83. Keana J., Gershon S., Wise R.P. i wsp.: Tuberculosis associated with Infliximab, a Tumor Necrosis Factor – neutralizing agent. *New Engl. J. Med.* 2001; 345: 1098–1104
84. Uma Devi K. R., Ramalingam B., Brennan P.J. i wsp.: Specific and early detection of IgG, IgA and IgM antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* 38kDa antigen in pulmonary tuberculosis. *Tubercle Lung Dis.* 2001; 81: 249-253
85. Patil S.A., Gourie-Devi M., Anand A.R. i wsp.: Significance of mycobacterial immune complex (IgG) in the diagnosis of tuberculosis meningitis. *Tubercle Lung Dis.* 1996; 77: 164-67
86. del Prete R., Picca V., Mosca A., d'Alagni M., Miragliotta G.: Detection of anti-lipoarabinomannan antibodies for the diagnosis of active tuberculosis. *Int. J. Tubercle Lung Dis.* 1998; 2, 160-167
87. Demkow U., Zielonka T. M., Michałowska-Mitczuk D. i wsp.: Przydatność oznaczania w surowicy przeciwciał IgG przeciwko antygenowi A60 w diagnostyce gruźlicy płuc. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 1999; 51: 99-105
88. Beyazova U., Rota S., Cevheroglu C. i wsp.: Humoral immune response in infants after BCG vaccination. *Tubercle Lung Dis.* 1995; 76, 248-253
89. Cole R.A., Lu H.M., Shi Y. Z. i wsp.: Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic assay based on the 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* on patients with pulmonary tuberculosis in China. *Tubercle Lung Dis.* 1996; 77: 363-368
90. Makinodan T.: Nature of decline in antigen-induced immunity with age. *Mech Ageing Dev* 1980; 14 (1-2), 165-172
91. Connolly M., Nunn P.: Women and tuberculosis. *World Health Stat Q* 1996; 49, 115-120
92. Surveillance of Tuberculosis in Europe – EuroTB. Report on tuberculosis cases notified in 2000. WHO Collaborating Centre. March 2003
93. Cohen J.H., Danel L., Cordier G. i wsp.: Sex steroid receptors in peripheral T cells: absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8 positive cells. *J. Immunol* 1983; 131, 2767-2771
94. Muller D, Chen M., Vikingsson A. i wsp.: Oestrogen influences CD4+ T lymphocytes activity in vivo and in vitro in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Immunology* 1995; 86, 162-167
95. Yamamoto Y., Saito H., Setogawa T. i wsp.: Sex differences in host resistance to *M. marinum* infection in mice. *Infect Immun* 1991; 59, 4089-4096
96. Ljungqvist L., Worsae A., Heron I.: Antibody responses against *Mycobacterium tuberculosis* in 11 strains of inbred mice: novel monoclonal antibody specificities generated by fusions, using spleens from Balb/b10 mice and CBA/J mice. *Infect. Immun.* 1988; 56: 549-555
97. Huygen K., Palfliet K., Jurion P. F. i wsp.: Antibody repertoire against culture filtrate antigens in wild house mice infected with *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin. Exp. Immunol.* 1990; 82: 369-372
98. Falla J.C., Parra C. A., Mendoza M. i wsp.: Identification of B- and T-cell epitopes within the MTP40 protein of *Mycobacterium tuberculosis* and their correlation with the disease course. *Infect. Immun.* 1991; 59: 2265-2273
99. Rook G. A., Hernandez-Pando R.: Cellular immune responses in tuberculosis-protection and immunopathology. *Med. Mal. Infect.* 1996; 26: 904-910
100. De Bruyn J., Huygen H., Van Vooren J. P. i wsp.: The 32-kDa protein antigen of *M. Bovis* BCG and *M. Tuberculosis* H37Rv. *Trop. Med. Parasitol.* 1990; 41: 331-332
101. Ivanyi J., Sharp K., Jackett P. i wsp.: Immunological study of the defined constituents of mycobacteria. *Springer Semin. Immunopathol.* 1988; 10: 279-300
102. Mazzarella G., Bianco A., Perna F. i wsp.: T lymphocyte phenotypic profile in lung segments affected by cavitory and non-cavitory tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 2003; 132: 283-288
103. Asherson G. L., Dieli F., Sireci G i wsp.: Role of IL-4 in delayed type hypersensitivity. *Clin. Exp. Immunol.* 1996; 103: 1-4
104. Dhand R., De A., Ganguly N.K. i wsp.: Factors influencing the cellular response in bronchoalveolar lavage and peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. *Tubercle* 1988; 69: 161-173
105. Farer S., Lowell A.M., Meador M.P.: Extrapulmonary tuberculosis in the United States. *Am. J. Epidemiol.* 1979; 109: 205
106. Rowińska-Zakrzewska E., Szopiński J., Remiszewski P. i wsp.: Tuberculosis in the autopsy material: analysis of 1500 autopsies performed between 1972 and 1991 in the Institute of Tuberculosis and Chest Diseases, Warsaw, Poland. *Tubercle Lung Dis.* 1995; 76, 349-54
107. D. Maziarka: Najczęstsze postacie gruźlicy pozapłucnej. *Klinika* 1995; 1: 33–37
108. Lee S.H., Abramson S.B.: Infections of the musculoskeletal system by *M. tuberculosis*. in Rom W.N., Garay S.M. „Tuberculosis” Boston, Little Brown, 1996; 635-644
109. Davidson P.T., L. H.Q.: Musculoskeletal tuberculosis in „Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections. WB Saunders, 1999; 204-220
110. Ellis M.E., El-Ramahi K.M., Al-Dalaan A.M.: Tuberculosis of peripheral joints: a dilemma in diagnosis. *Tubercle Lung Dis.* 1993; 74, 399-404
111. Resnick D., Niwayama G.: Osteomyelitis, septic arthritis and soft tissue infection: The organisms. w *Diagnosis of bone and joint disorders.* 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders 1988; 2661-2687
112. Małowski S.: Gruźlica kości i stawów. PZWL 1976
113. Thwaites G. E., Chau T.T.H., Stępniewska K. i wsp.: Diagnosis of adult tuberculous meningitis by use of clinical and laboratory features. *Lancet* 2002; 360: 1287-1292
114. Ota. M., Vekemans J., Schlegel-Haueter S. i wsp. Influence of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin on antibody and cytokine responses to human neonatal vaccination. *J. Immunol.* 2002; 168, 919-925
115. Mondal A: Cytological diagnosis of vertebral tuberculosis with fine-needle aspiration biopsy. *Am. J. Bone Joint Surg.* 1994; 76: 181-184
116. Kanoudhis M, van der Spel A., Shipley C.A. i wsp.: Diagnosis of tuberculosis of skeletal tuberculosis by PCR. *Br. J. Bone Joint Surg.* 1996; 78 (Suppl 2): 97
117. Alifano M., Del Pezzo M., Lamberti C., Faraone S., Covelli I.: Elisa method for evaluation of anti-A60 IgG in patients with pulmonary and extrapulmonary tuberculosis. *Microbiologica* 1994; 17: 37-44
118. Alifano M., de Pascalis R., Sofia M., Faraone S., del Pezzo M., Covelli I.: Detection of IgG and IgA against the mycobacterial antigen A60 in patients with extrapulmonary tuberculosis. *Thorax* 1998; 53, 377-385
119. Malati T., Kumari G., Dinakar I.: Evaluation of A60 antibodies in pulmonary and neurotuberculosis. *Indian J. Clin. Biochem* 1995; 10: 72-76
120. Chierakul N., Damrongchokpipat P., Chaiprasert A. i wsp.: Antibody detection for the diagnosis of tuberculosis pleuritis. *Int. J. Tuberc Lung Dis.* 2001; 5: 968-972

121. Majewska-Zalewska H.: Gruźlica płuc u dzieci. *Medi-press* 1999; 4, 2: 3-13
122. Eamranod P., Jaramillo E.: Tuberculosis in children: re-assessing the need for improved diagnosis in global control strategies. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2001; 5 (7): 594-603
123. Starke J. R.: Childhood tuberculosis: ending the neglect. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2002; 6: 373-374
124. Klotz S.A., Penn R.L.: Acid-fast staining of urine and gastric contents is an excellent indicator of mycobacterial disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 136, 1197-98
125. Starke J.R., Ong L.T., Eisenach K.D. i wsp.: Detection of *M. tuberculosis* in gastric aspirate samples from children using polymerase chain reaction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; 147, A801
126. Imaz M.S., Domini M.A., Zerbini E. i wsp.: Evaluation of the diagnostic value of measuring IgG, IgM and IgA antibodies to the recombinant 16-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in childhood tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2001; 5: 1036-1043
127. Gupta S., Bhatia R., Datta K.K.: Serological diagnosis of childhood tuberculosis by estimation of mycobacterial antigen 60 specific immunoglobulins in the serum. *Tubercle Lung Dis.* 1997; 78, 21-28
128. Delacourt C., Gobin J., Gaillard J-L. i wsp.: Value of ELISA using antigen 60 for the diagnosis of tuberculosis in children. *Chest* 1993; 104, 393-398
129. Patil S.A., Gourie-Devi M., Anand A.R. i wsp.: Significance of mycobacterial immune complex (IgG) in the diagnosis of tuberculosis meningitis. *Tubercle Lung Dis.* 1996; 77, 164-67
130. Doucet-Populaire F. i wsp.: A blind study of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *Tubercle Lung Dis.* 1996; 77, 358-62
131. Lebrun L., Mathieu D., Saulnier C. i wsp.: Limits of commercial molecular tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 1997; 10: 1874-76
132. Leowski J., Miller M.: Tuberculosis in Poland an overview. Institute of Tuberculosis, Warsaw 1993
133. Chiang I-H., Suo J., Bai K-J. i wsp.: Serodiagnosis of tuberculosis: a study comparing three specific mycobacterial antigens. *Am. J. Respir. Care Med.* 1997; 156, 906-911
134. Mankiewicz E.: Mycobacteriophages isolated from persons with tuberculosis and non-tuberculous conditions. *Nature* 1961; 191:1416-1417
135. Richter E. i wsp.: Assessment of mycobacterial DNA in cells and tissues of mycobacterial and sarcoid lesions. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153: 375-80
136. Stroebel A.B., Daniel T.M., Lau J.H.K., Leong J.C.Y., Richardson H.: Serologic diagnosis of bone and joint tuberculosis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Infect. Dis.* 1982; 146: 280-283
137. Zou Y.L., Zhang J.D., M. H. Chen, Shi G.Q., Pringnot J., Cocito C.: Serological analysis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis with enzyme-linked immunosorbent assays for anti-A60 immunoglobulins. *Clin. Infect. Dis.* 1994; 19: 1084-1091
138. U. Demkow, T. Zielonka, M. Nowak-Misiak, M. Filewska i wsp.: Humoral immune response against 38-kDa and 16-kDa mycobacterial antigen in bone and joint tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2002; 6, 1023-1028
139. Delacourt C., Poved J-D., Churean C. i wsp.: Use of polymerase chain reaction for improved diagnosis of tuberculosis in children. *J. Pediatr.* 1995; 126: 703-709
140. Rosales-Borjas D.M., Zambrano-Villa S., Elinos M. i wsp.: Rapid screening test for tuberculosis using a 38-kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Lab. Anal.* 1998; 12, 126-9
141. Chan E.D., Reves R. Belisle J.T., Brennan P. Hahn W.E.: Diagnosis by visually detectable immunoassay for lipoarabinomannan. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161: 1713-1719
142. Rasolofo V., Rasolonavalona T., Ramarokoto H., Chanteau S.: Predictive values of the ICT Tuberculosis test for routine diagnosis of tuberculosis in Madagascar. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2000; 4: 184-185
143. McConkey S.J., Youssef F.G., Azem E. i wsp.: Evaluation of a rapid format antibody test and the tuberculin skin test for diagnosis of tuberculosis in two contrasting endemic settings. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2002; 6: 246-252
144. Raja A., Baughman R. P., Daniel T. The detection by immunoassay of antibody to mycobacterial antigens in bronchoalveolar lavage fluid from patients with tuberculosis and control subjects. *Chest* 1988; 94: 133-137
145. Trautner B. W., Darouiche R. O. Tuberculous pericarditis: optimal diagnosis and management. *Clin Infect Dis.* 2001; 33: 954-961
146. Levy H., Wayne L.G., Anderson B. E. i wsp.: Antimycobacterial antibody levels in pleural fluid as reflection of passive diffusion from serum. *Chest* 1990; 97: 1144-1147
147. Watt G., Zaraspe G., Bautista S. i wsp.: Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by using an enzyme-linked immunosorbent assay to detect mycobacterial antigen and antibody in cerebrospinal fluid. *J. Infect. Dis.* 1988; 158: 681-686
148. Bothamley G., Batra H., Ramesh V. i wsp.: Serodiagnostic value of the 19 kDa antigen of *M. tuberculosis* in Indian patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1992; 11: 912-915
149. Burgess L.J., Reuter H., Carstens M.E. i wsp.: Cytokine production in patients with tuberculous pericarditis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2002; 6: 439-446
150. Grange J.M.: Diagnostic tests for tuberculosis and their evaluation. *Sem. Respir. Infect.* 1994; 9, 71-77
151. Demkow U., Zielonka T.M., Filewska M. i wsp.: Przydatność oznaczania przeciwciał przeciwprątkowych 38 kDa metodą immunochromatograficzną w rozpoznawaniu gruźlicy. *Pneum. Alergol. Pol.* 2000; 68, 355-362
152. Caminero J.A., de Castro F.R., Diaz F. i wsp.: Diagnosis of pleural tuberculosis by detection of specific IgG anti-antigen 60 in serum and pleural fluid. *Respiration* 1993, 60, 58-52
153. Prior C. i wsp.: Pulmonary sarcoidosis: patterns of cytokine release in vitro. *Eur. Respir. J.* 1996; 9: 47-53
154. Demkow U., Zielonka T.M., Strzalkowski J. i wsp.: Diagnostic value of IgG serum level against 38-kDa mycobacterial antigen. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 1998; 66, 509-516

