

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Wydział Lekarski II

Paweł Gruszczyński

**OCENA ZNACZENIA TESTU DIAGNOSTYCZNEGO
QUANTIFERON-TB GOLD IN TUBE
W ROZPOZNAWANIU ZAKAŻEŃ PŁUCNYCH
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

Rozprawa doktorska

Promotor

Prof. dr hab. med. Halina Batura - Gabryel

Spis treści

| | |
|---|-----------|
| Wykaz skrótów | 4 |
| 1. Wstęp | 6 |
| 1.1. Gruźlica – ważny problem epidemiologiczny i społeczny..... | 6 |
| 1.2. Laboratoryjna diagnostyka gruźlicy..... | 13 |
| 1.2.1. Klasyczne metody mikrobiologiczne..... | 14 |
| 1.2.1.1. Bakterioskopia..... | 14 |
| 1.2.1.2. Metody hodowlane..... | 17 |
| 1.2.2. Diagnostyka metodami biologii molekularnej..... | 20 |
| 1.2.3. Diagnostyka histologiczna..... | 22 |
| 1.2.4. Immunologiczne metody diagnostyczne w gruźlicy..... | 24 |
| 1.2.4.1. Metody oparte na badaniu odpowiedzi humoralnej..... | 24 |
| 1.2.4.2. Metody oparte na badaniu odpowiedzi komórkowej..... | 25 |
| 2. Cel pracy | 31 |
| 3. Materiał i metody | 32 |
| 3.1. Charakterystyka badanej populacji..... | 32 |
| 3.2. Zakres badań..... | 33 |
| 3.2.1. Badania mikrobiologiczne..... | 33 |
| 3.2.1.1. Opracowanie materiału klinicznego do badania mikrobiologicznego..... | 35 |
| 3.2.1.2. Ocena preparatu bezpośredniego w kierunku prątków kwasoopornych..... | 36 |
| 3.2.1.3. Hodowla w kierunku prątków kwasoopornych..... | 36 |
| 3.2.2. Badania genetyczne..... | 37 |
| 3.2.2.1. Przygotowanie próbek..... | 37 |
| 3.2.2.2. Amplifikacja..... | 37 |
| 3.2.2.3. Detekcja..... | 38 |
| 3.2.3. Badanie histologiczne..... | 38 |
| 3.2.4. Test QuantiFERON-TB Gold in tube..... | 39 |
| 3.3. Opracowanie statystyczne..... | 41 |
| 4. Wyniki | 43 |
| 4.1. Charakterystyka grupy badanej..... | 43 |
| 4.2. Wyniki badań mikrobiologicznych w badanej populacji..... | 44 |
| 4.3. Wyniki badań mikrobiologicznych w grupie pacjentów z definitywnym rozpoznaniem gruźlicy..... | 45 |
| 4.4. Wyniki testu QuantiFERON-TB Gold in tube..... | 46 |
| 4.5. Analiza statystyczna wyników testu QFT..... | 51 |
| 4.5.1. Analiza statystyczna w ujęciu jakościowym..... | 51 |
| 4.5.2. Analiza statystyczna w ujęciu ilościowym..... | 52 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.6. | Próba wyznaczenia optymalnej wartości <i>cut-off</i> testu QFT | 53 |
| 4.7. | Czy można wykorzystać parametry składowe testu QFT do różnicowania grupy pacjentów z rozpoznaną gruźlicą od pacjentów z innymi rozpoznaniem? | 56 |
| 5. | Dyskusja | 60 |
| 6. | Wnioski | 73 |
| 7. | Streszczenie w języku polskim | 74 |
| 8. | Streszczenie w języku angielskim | 77 |
| 9. | Piśmiennictwo | 80 |

Wykaz skrótów

AFB – acid fast bacilli – bakterie kwasooporne

AIDS – acquired immune deficiency syndrome - zespół nabytego niedoboru odporności

A-15 - wg nomenklatury ICD-10: gruźlica układu oddechowego, bakteriologicznie i histologicznie potwierdzona

A-16 – wg nomenklatury ICD-10: gruźlica układu oddechowego, bakteriologicznie i histologicznie ujemna

BCG - Bacillus Calmette-Guérin

CFP-10 – culture filtrate protein – antygen białkowy, produkt regionu RD1

CI – confidence interval – przedział ufności

DNA – deoxiribonucleic acid - kwas dezoksyrybonukleinowy

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay – test immunoenzymatyczny (immunoenzymosorbcyjny)

ESAT-6 – early secretory antigenic target – antygen białkowy, produkt regionu RD1

FN – false negative – wyniki fałszywie ujemne

FP – false positive – wyniki fałszywie dodatnie

H + E – hematoksylina + eozyna – technika barwienia histochemicznego

HIV – human immunodeficiency virus - ludzki wirus niedoboru odporności

ICD-10 - International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems - Międzynarodowa Klasyfikacja Chorób i Problemów Zdrowotnych

IGRA – interferon-gamma release assay – test uwalniania interferonu-gamma

IP – inducible protein (rodzaj chemokiny)

I.U. – international units – jednostki międzynarodowe

kDA – kilodalton – nazwa jednostki masy atomowej

LAM – lipoarabinomannan

L-J – podłoże Loewenstein-Jensen

MDR – multidrug resistance – oporność wielolekowa

MGIT – mycobacteria growth indicator tube – probówka ze wskaźnikiem wzrostu mykobakterii

n/o – nieokreślony (dot. kategorii wyniku testu QFT)

PCR – polymerase chain reaction – polimerazowa reakcja łańcuchowa

QFT – QuantiFERON[®]-TB Gold In Tube

RD – region of difference – region różnicowania

RLU – relative luminescence unit – względna jednostka luminescencji

RNA – ribonucleic acid – kwas rybonukleinowy

ROC – receiver operating characteristic – charakterystyka operacyjna odbiornika

rRNA – ribosomal ribonucleic acid – rybosomalny kwas rybonukleinowy

SD – standard deviation – odchylenie standardowe

SDA – stand displacement amplification – nazwa własna systemu amplifikacji DNA firmy Beckton Dickinson

TMA – transcription mediated amplification – nazwa własna systemu amplifikacji rRNA firmy Gen-Probe

TN – true negative – wyniki prawdziwie ujemne

TP – true positive – wyniki prawdziwie dodatnie

WHO – World Health Organization - Światowa Organizacja Zdrowia

XDR – extensive drug resistance – poszerzona lekooporność

1. Wstęp

1.1. Gruźlica – ważny problem epidemiologiczny i społeczny

Gruźlica to choroba zakaźna towarzysząca człowiekowi od zarania dziejów. Czynnikiem etiologicznym gruźlicy są kwasooporne prątki należące do kompleksu *Mycobacterium tuberculosis*. W skład kompleksu, o przynależności do którego decydują z jednej strony obraz kliniczny wywoływanego schorzenia, a z drugiej budowa genomu, wchodzi następujące gatunki prątków: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*. Do kompleksu należy również atenuowany szczep szczepionkowy *Mycobacterium bovis* BCG. Nie wywołuje on jednak u osób immunokompetentnych objawów gruźlicy (1).

Uważa się, że prątki, będące przyczyną gruźlicy, spowodowały w historii ludzkości śmierć większej liczby osób, niż jakkolwiek inny drobnoustrój. Do niedawna za najstarsze przypadki gruźlicy uważano te, które identyfikowano na podstawie stwierdzenia zmian anatomopatologicznych obserwowanych w materiałach archeologicznych: wykopaliskach i mumiach. Zmiany gruźlicze w tych przypadkach dotyczyły układu kostnego. Liczba tego rodzaju doniesień ciągle rośnie, dowodząc powszechności zmian o charakterze gruźlicy u ludzi i hominidów w różnych epokach i różnych miejscach kuli ziemskiej. Za najstarsze w ten sposób zidentyfikowane znalezisko uważa się szczątki *Homo erectus* odnalezione w Turcji, a pochodzące ze środkowego plejstocenu. Zmiany zaobserwowane w kościach czaszki tego hominida zdiagnozowano jako *Leptomeningitis tuberculosa* (2).

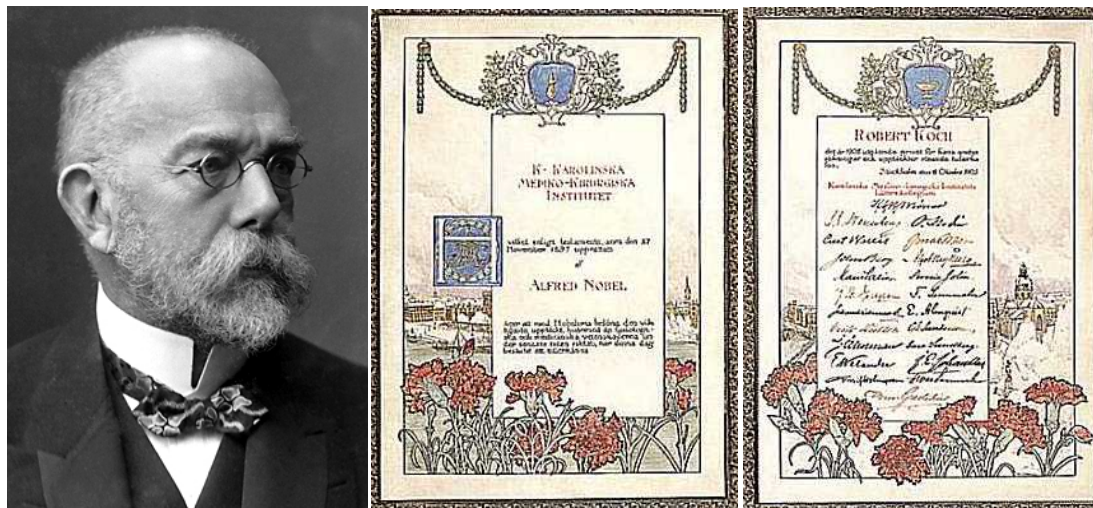
Nowych narzędzi dla obserwacji historii tych drobnoustrojów wśród gatunku ludzkiego dostarczyła biologia molekularna. Należy podkreślić, iż to właśnie badania nad historią naturalną gruźlicy w głównej mierze przyczyniły się do powstania nowej

gałęzi nauki jaką jest paleomikrobiologia (3). Kwasy nukleinowe, które są przedmiotem identyfikacji przy użyciu metod genetycznych, są strukturami niezwykle labilnymi. W przypadku prątków mamy jednak do czynienia ze sprzyjającymi okolicznościami: prątki posiadają wyjątkowo odporną na działanie czynników środowiskowych, bogatą w lipidy ścianę komórkową, która chroni zawartość komórki, a wysoka zawartość guaniny i cytozyny w ich kwasie dezoksyrybonukleinowym wpływa korzystnie na jego stabilność. Poszukiwanie i zidentyfikowanie w materiałach kopalnych sekwencji DNA charakterystycznych dla prątków gruźlicy pozwoliło w sposób jednoznaczny stwierdzić obecność samych drobnoustrojów, a także prześledzić ich filogenezę. Do niedawna za najstarsze w ten sposób datowane znaleziska uważano egipskie mumie, w których obecność zmian w kośćcu korelowała z obecnością w nich sekwencji DNA charakterystycznych dla *M. tuberculosis* (4). Ostatnio ukazały się doniesienia o odkryciu w warstwie iłów pod powierzchnią morza u wybrzeży Izraela jeszcze starszego znaleziska – liczących 9.000 lat szkieletów kobiety i dziecka, w których zidentyfikowano DNA prątków (5).

W czasach historycznych, w źródłach pisanych gruźlica – jako phtisis (gr. *phthisis* – rozpad) – pojawia się bodaj po raz pierwszy u Hipokratesa, który pisze w swych Aforyzmach (ok. 400 lat przed Chr.) w rozdziale V, że „*phthisis*” występuje najczęściej pomiędzy 18 a 35 rokiem życia. Arystoteles podejrzewa zakaźny charakter choroby. Gallen (II w. po Chr.) podaje opis gruźlicy pisząc, że jest to „owrzodzenie płuc, klatki piersiowej lub gardła, któremu towarzyszy kaszel oraz wyniszczenie organizmu z powodu ropienia”. Opisuje też gruźlicę jako chorobę niedożywienia (6).

Milowym kamieniem na drodze poznania natury choroby oraz czynnika ją wywołującego były prace niemieckiego lekarza Roberta Kocha (1843-1910), który

pracując m.in. na stanowisku lekarza powiatowego w Wolsztynie dokonał w roku 1882 odkrycia prątków gruźlicy.



Rys. 1. Robert Koch oraz przyznany mu dyplom Nagrody Nobla (7)

W roku 1905 został uhonorowany Nagrodą Nobla. Potwierdził ostatecznie zakaźny charakter choroby, który przed wiekami sugerował już Arystoteles. Jego odkrycie umożliwiło wykrywanie osób wydalających prątki, a więc wykrywanie osób zakażających. Koch zdawał sobie jednak sprawę, że to tylko początek poczynań na drodze walki z chorobą. Wskazywał też na sposoby walki z nią: niezbędną pomoc państwa, konieczność rejestracji chorych oraz stworzenie warunków do ich izolacji od osób zdrowych (8).

Dziś gruźlica jest ciągle istotnym problemem epidemiologicznym, medycznym i społecznym współczesnego świata. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia w 2009 roku na całym świecie na gruźlicę chorowało 14 mln osób, w tym 9,4 mln były to przypadki po raz pierwszy w tym roku zarejestrowane. Zmarło na tę chorobę 1,3 mln osób HIV-ujemnych i 380 tys. HIV-dodatnich. Zapadalność na gruźlicę

wynosiła w roku 2009 137/100.000 w skali świata. Dla sytuacji epidemiologicznej w skali globu znaczenie mają również następujące dane:

1. liczba chorych, u których stwierdzono prątki w preparacie bezpośrednim wśród chorych noworejestrowanych (57% noworejestrowanych przypadków w roku 2009);
2. liczba pacjentów noworejestrowanych ze współistniejącym zakażeniem wirusem HIV (12% noworejestrowanych przypadków w roku 2009);
3. liczba pacjentów, u których stwierdzono gruźlicę wywołaną wielolekoopornym szczepem *M. tuberculosis* (440 tys. – dane za rok 2008) (9).

Wysoki odsetek chorych prątkujących przesądza o fakcie istnienia ciągle niemożliwego do przerwania łańcucha epidemicznego. Przyjmuje się bowiem, że jedna osoba prątkująca kaszląc zakaża 10 osób w ciągu roku (10).

Pacjenci ze współistniejącym zakażeniem wirusem HIV stanowią szczególne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Wszyscy oni powinni być bowiem poddani terapii antyretrowirusowej. Gruźlica jest ciągle główną przyczyną śmierci wśród zakażonych HIV oraz chorych na AIDS. Zgodnie z założeniami programów profilaktycznych WHO, skoordynowane działania powinny doprowadzić z jednej strony do zmniejszenia problemu HIV w populacji chorych na gruźlicę, z drugiej zmniejszenia problemu gruźlicy w populacji zakażonych wirusem HIV.

Wielolekooporne szczepy *M. tuberculosis* (MDR) stanowią poważny problem terapeutyczny. Występowanie takiego mechanizmu oporności ogranicza bowiem i tak krótką listę leków przeciwprątkowych. W skrajnych przypadkach dochodzi do wyselekcjonowania szczepów o poszerzonej lekooporności XDR, wobec których często nie istnieje żadna opcja terapeutyczna. Chorzy zakażeni takimi szczepami stanowią rezerwuuar prątków, którymi mogą zakażać kolejne osoby ze swojego

otoczenia. Jest to zjawisko niebezpieczne zwłaszcza w zamkniętych środowiskach – obozach, więzieniach. Doprowadziło to do olbrzymiego rozprzestrzenienia tych szczepów w krajach poradzieckich.

Rozprzestrzenienie gruźlicy na świecie jest bardzo nierównomierne. Rzuca się w oczy zależność liczby zachorowań od poziomu socjoekonomicznego danego regionu. Pięć państw o najwyższej bezwzględnej liczbie chorych na gruźlicę to w roku 2006 Indie, Chiny, Nigeria, Bangladesz, Indonezja. Zapadalność zaś najwyższa jest w Regionie Afrykańskim (według podziału WHO), gdzie wynosi 340/100.000.

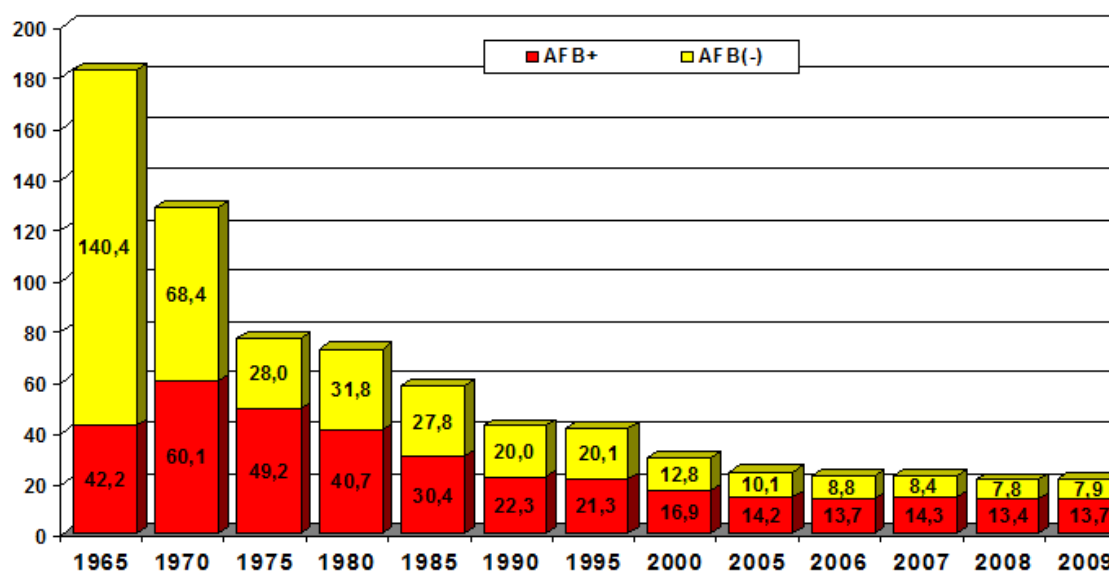
W Regionie Europejskim WHO zapadalność na gruźlicę wynosi 47,1/100.000 (9). Również w obrębie tego regionu mamy do czynienia z ogromnym zróżnicowaniem sytuacji epidemiologicznej, która podobnie jak w skali świata uzależniona jest od poziomu rozwoju gospodarki. W skład Regionu Europejskiego w ujęciu WHO wchodzi subregiony, w których zapadalność na gruźlicę wynosi odpowiednio:

1. Unia Europejska (27 państw) i 7 państw zachodu (oprócz Monako i San Marino) – 17,4/100.000
2. Bałkany (7 państw) – 28,1/100.000
3. Wschód (12 państw) – 110,3/100.000

Najwyższa zapadalność spośród państw Regionu Europejskiego występuje w Kazachstanie (282,1/100.000), najniższa zaś na Islandii i na Cyprze (po 4,4/100.000) (11).

Zapadalność na gruźlicę w Polsce umiejscawia ją wśród państw o średnim stopniu zapadalności. Polska jest przykładem kraju, który dzięki sprawnym programom prewencyjnym, dobrze zorganizowanej sieci specjalistycznych poradni

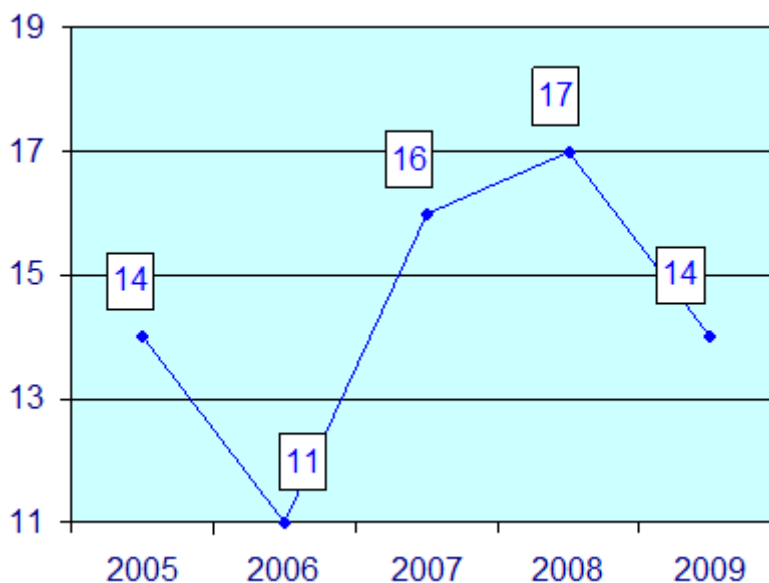
przeciwgruźliczych i oddziałów szpitalnych specjalizujących się w diagnostyce i leczeniu gruźlicy oraz sieci działających na ich potrzeby laboratoriów mikrobiologicznych, poczynił na przestrzeni kilkudziesięciu lat olbrzymi postęp w sytuacji epidemiologicznej w zakresie gruźlicy. W okresie od roku 1965 do 2005 nastąpił 9-krotny spadek zapadalności (rys. 2) (12).



Rys. 2. Zapadalność na gruźlicę wszystkich postaci w Polsce w latach 1965-2009. Współczynniki na 100.000 ludności (12).

Dalszy i szybszy spadek zapadalności został zahamowany niekorzystnymi zmianami mającymi miejsce w ochronie zdrowia (demontaż sieci poradni przeciwgruźliczych, niedostateczne finansowanie, brak jasnego systemu nadzoru epidemiologicznego). Biorąc pod uwagę ścisły związek sytuacji epidemiologicznej w zakresie gruźlicy z sytuacją ekonomiczną, należy również w jej pogorszeniu w niektórych grupach społecznych upatrywać spowolnienia korzystnych trendów. Wydaje się, że obecnie sytuacja epidemiologiczna w zakresie gruźlicy uległa w Polsce niekorzystnej stabilizacji. Nie obserwuje się już od 5 lat spadku zapadalności w skali kraju, a wszelkie zmiany w tym zakresie w ciągu tego okresu

(zarówno wzrost jak i spadek) mają swoje źródło w niedoskonałości systemu sprawozdawczości. Świadczyć o tym mogą obserwowane w skali województw zmiany zapadalności, których skali nie można wytłumaczyć zjawiskami epidemiologicznymi, a jedynie błędami w rejestracji przypadków (rys. 3).



Rys. 3. Zapadalność na gruźlicę w województwie wielkopolskim w latach 2005-2009 (ilość przypadków/100.000) (12).

Należy podejmować nadal wszelkie starania, aby zapadalność na gruźlicę realnie obniżyć. Działania zmierzające ku temu muszą obejmować zarówno obszar diagnostyki (w tym laboratoryjnej) i leczenia, jak profilaktyki i organizacji (koordynacji) działań. O ile celem globalnym w skali świata – zgodnie z założeniami programu Światowej Organizacji Zdrowia STOP TB jest powstrzymanie wzrostu zapadalności na gruźlicę do roku 2015, to dla Polski celem takim mogłoby być ograniczenie zapadalności do wielkości, która umożliwiłaby umiejscowienie Polski w gronie państw o niskiej zapadalności, a więc niższej niż 10 przypadków na 100.000 ludności (13). Realna analiza linii trendu spadku zapadalności każe jednak ten cel w danej

perspektywie czasowej uznać za nierealny. Taka sytuacja każe wnikliwie przyglądać się wszelkim nowościom na rynku produktów diagnostycznych, które usprawniając proces wczesnego rozpoznawania osób zakażonych prątkiem gruźlicy oraz chorych na gruźlicę pozwolą na jak najwcześniejsze przerwanie łańcucha epidemicznego poprzez wdrożenie procedur profilaktycznych, izolacyjnych i terapeutycznych.

1.2. Laboratoryjna diagnostyka gruźlicy

Specyficzny charakter drobnoustroju wywołującego gruźlicę – kwasoopornych prątków należących do kompleksu *Mycobacterium tuberculosis* – sprawia, że jego diagnostyka ograniczona jest do wąskiego kręgu wyspecjalizowanych laboratoriów mikrobiologicznych. Ich liczba w Polsce nie przekracza 90. W zależności od stopnia referencyjności (zakresu wykonywanych badań) laboratoria te dzieli się na laboratoria I, II i III rzędu. Laboratoria III rzędu oferują pełen zakres badań w zakresie mikrobiologicznej diagnostyki gruźlicy. Laboratoria I rzędu, wykonujące tylko badania mikroskopowe, charakterystyczne są dla krajów Trzeciego Świata i w Polsce nie występują. Zgodnie z rekomendacjami Światowej Organizacji Zdrowia jedno laboratorium II rzędu powinno przypadać na milion mieszkańców kraju, natomiast jedno laboratorium III rzędu powinno obsługiwać populację 3 – 4 milionów mieszkańców. Nadrzedną rolę nad siecią laboratoriów pełni krajowe referencyjne laboratorium prątka (14). Wynika z powyższego, że sieć laboratoriów prątka ciągle jest w Polsce nadmiernie rozbudowana. Sieć tę charakteryzuje również pewna nierównomierność, gdyż obok województw o prawidłowej strukturze sieci (np. województwo wielkopolskie) są województwa o dużej liczbie laboratoriów wykonujących stosunkowo niewielką liczbę badań. Tylko w przypadku laboratoriów wykonujących dużą liczbę badań można mówić o nabyciu przez nie biegłości

zapewniającej odpowiedni poziom diagnostyki. Należy pamiętać, że dokładne i szybkie wykrycie prątków metodami mikrobiologicznymi w materiałach pochodzących od chorych stanowi jeden z najważniejszych elementów programu DOTS (*Directly Observed Treatment Short-Course*) ciągle obowiązującego w zwalczaniu gruźlicy na świecie, a za definitywny przypadek gruźlicy uważa się jedynie przypadek potwierdzony dodatnim wynikiem badania mikrobiologicznego (15). Współcześnie mikrobiolog ma do dyspozycji szeroki wachlarz metod diagnostycznych, z których część w niemal niezmięnionej postaci funkcjonuje od czasów Roberta Kocha. Postęp technologiczny sprawia jednak, że do tej grupy metod dołączyły nowe metody – szybsze, czulsze, zapewniające wysoką specyficzność. Są to przede wszystkim metody wykorzystujące technologie biologii molekularnej. Ciągle dyskusyjna jest wartość i przydatność metod immunologicznych (wykorzystujących mechanizmy odpowiedzi humoralnej lub komórkowej) w diagnostyce gruźlicy.

1.2.1. Klasyczne metody mikrobiologiczne

1.2.1.1. Bakterioskopia

Bakterioskopia jest pierwszym i najważniejszym badaniem mikrobiologicznym, jakie należy wykonać w przypadku podejrzenia gruźlicy u pacjenta. Jest to badanie proste, tanie i szybkie. Zaletą badania jest łatwość uzyskania podstawowego w diagnostyce gruźlicy płuc materiału diagnostycznego jakim jest plwocina. Dodatni wynik rozmazu mikroskopowego materiału klinicznego wraz z obecnością określonych objawów klinicznych oraz zmian radiologicznych daje lekarzowi bliskie pewności potwierdzenie gruźliczej etiologii choroby. Niezwykle istotny jest epidemiologiczny aspekt tego badania, gdyż pozwala na szybkie

izolowanie pacjenta, a co za tym idzie przerwanie łańcucha epidemiologicznego. Niestety, badanie rozmazu mikroskopowego obarczone jest również pewnymi ograniczeniami i wadami. Najpoważniejszą wadą jest niska czułość badania. Dla zaobserwowania pojedynczych prątków w rozmazie preparatu bezpośredniego wykonanego z materiału klinicznego musi on zawierać 5000 – 10000 komórek prątków w 1 mililitrze (16). Wśród wszystkich zarejestrowanych w roku 2009 w Polsce przypadków gruźlicy potwierdzonej bakteriologicznie dodatni wynik bakterioskopii uzyskano jedynie w 58,7% przypadków (12). Drugim poważnym ograniczeniem tej metody jest brak absolutnej specyficzności wobec prątków kompleksu *Mycobacterium tuberculosis*. Wykorzystywana w barwieniu preparatów prątków cecha kwasooporności jest bowiem cechą zarówno prątków kompleksu *Mycobacterium tuberculosis* jak i prątków niegruźliczych, a także drobnoustrojów z rodzaju *Nocardia* (16).

Kwasooporność jest fizyczną własnością niektórych bakterii, odnoszącą się do ich oporności na odbarwienie kwaśnymi roztworami alkoholi podczas procedury barwienia. Drobnoustroje kwasooporne trudno scharakteryzować przy użyciu standardowych technik mikrobiologicznych (np. barwione metodą Grama często wykazują wynik wątpliwie dodatni). Kwasooporność jest spowodowana budową ściany komórkowej, która jest bardzo bogata w kwasy mykolowe, które w połączeniu z barwnikami anilinowymi tworzą trwałe kompleksy (17).

Twórcami stosowanej do dziś techniki barwienia prątków byli niezależnie Franz Ziehl (1857-1926) oraz Friedrich Neelsen (1854-1894). Niezależnie od siebie opracowali w roku 1882 metodę barwienia drobnoustrojów kwasoopornych, która do dziś nazywana jest metodą Ziehl-Neelsena. Jako barwnik podstawowy wykorzystywana jest w niej fuksyna karbolowa. Obecnie coraz częściej wykorzystuje

się barwniki fluorescencyjne i technikę mikroskopii fluorescencyjnej. Najczęściej wykorzystywanym barwnikiem jest auramina O, która, podobnie jak fuksyna karbolowa, tworzy ze składnikami ściany komórkowej prątków nie wypłukujące się kwaśnymi odfarbiaczami trwałe kompleksy. Uważa się, że technika fluorescencyjna ma nieco wyższą czułość. Podstawową zaletą tej techniki jest jednak krótszy czas potrzebny do obserwacji preparatów mikroskopowych, co jest możliwe dzięki stosowaniu w tej technice mniejszych niż w metodzie Ziehl-Neelsena powiększeń (typowo 400-krotne). Umożliwia to obserwację większej powierzchni preparatu w pojedynczym polu widzenia mikroskopu (18). Warto nadmienić, że jeszcze w roku 1948 najwybitniejszy polski ftyzjatra tamtych czasów – Eugenia Piasecka-Zeyland pisała o tej powszechnie dziś stosowanej metodzie:

„Począwszy od r. 1937 wznowiono próby stosowania promieni pozafioletkowych do rozpoznawania mikroskopowego prątków gruźlicy potraktowanych odpowiednimi fluorochromami (siarczanem berberyny) i przede wszystkim auraminą. Metoda ta wymaga nie tylko osobnego urządzenia (aparat fluorescencyjny czyli luminescencyjny), lecz i osobnego pokoju z usuwaniem szkodliwych azotynów. Krytyczny przegląd powstałego na ten temat piśmiennictwa doprowadza do wniosku, że uzyskane wyniki nie usprawiedliwiają kosztów.” (19)

Nieaktualność tego stwierdzenia pozwala żywić nadzieję, że inne metody diagnostyczne, dziś uważane za zbyt drogie, w przyszłości będą używane tak powszechnie, jak dziś stosuje się barwienie fluorescencyjne. Inna myśl docent Eugenii Piaseckiej-Zeyland zawarta w cytowanej pracy do dnia dzisiejszego nie straciła nic ze swojej aktualności:

„...bakterioskopia w bakteriologicznym rozpoznawaniu gruźlicy jest metodą bardzo cenną, ale aby móc należycie z niej korzystać, trzeba dokładnie znać wszystkie jej ograniczenia”. (19)

1.2.1.2. Metody hodowlane

Prekursorem zastosowania metody hodowli w diagnostyce gruźlicy był Robert Koch. Pierwsze wyhodowane przez niego prątki gruźlicy wzrosły na podłożu, które stanowiła termicznie koagulowana surowica umieszczona w probówce w formie skosu. Materiałem jakiego użył do posiewu były gruźelki gruźlicze pobierane pośmiertnie od zmarłych na gruźlicę pacjentów berlińskich szpitali. W ciągu dziesięcioleci dopracowano optymalną formułę podłoża służącego wspólnie do hodowli prątków w większości laboratoriów na świecie. Jest to podłoże Loewenstein-Jensen. Loewenstein pierwotnie opracował podłoże do hodowli prątków zawierające czerwień Kongo i zieleń malachitową — barwniki częściowo hamujące wzrost innych bakterii (20). Obecna formuła, opracowana przez Jensena, charakteryzuje się nieznacznie zmodyfikowaną zawartością cytrynianów i fosforanów oraz zwiększonym stężeniem zieleni malachitowej i nie zawiera czerwieni Kongo (21). Główne składniki tego podłoża to jaja kurze, glicerol, L-asparagina oraz sole mineralne. Glicerol jest źródłem węgla w podłożu, związki organiczne zawarte w jajach (zwłaszcza żółtkach) stanowią materiał do budowy składników lipidowych, L-asparagina jest źródłem azotu. Czas oczekiwania na wynik ujemny hodowli założonej na tym podłożu wynosi 10 tygodni. Jeżeli materiał od chorego jest bogaty w prątki, charakterystyczne kolonie prątków zaczynają wzrastać na podłożu w 4 – 6 tygodniu hodowli. Długi okres oczekiwania na wynik hodowli (zarówno dodatni jak i ujemny) jest powodem, dla którego coraz powszechniej używa się

tzw. szybkich systemów hodowlanych. Dwa istotne elementy tych systemów, decydujące o ich wysokiej czułości oraz skróconym w stosunku do konwencjonalnej metody hodowli czasie wykrycia prątków to:

- płynne podłoże hodowlane (podłoże Middlebrooke'a 7H9),
- system automatycznej detekcji wzrostu prątków.

Obecnie w rutynowym użyciu w pracowniach bakteriologicznych całego świata znajdują się dwa systemy, różniące się sposobem detekcji. Poniżej opisano te dwa systemy.

MB/BacT

Butelka z podłożem wzrostowym zawiera wskaźnik reagujący na zmianę stężenia dwutlenku węgla wydzielanego w czasie wzrostu bakterii. Pomiar kolorymetryczny jest dokonywany w sposób ciągły, a stwierdzenie przez system wzrostu jest sygnalizowane przez aparat (22).

MGIT 960

System wykorzystuje probówki MGIT (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*) ze wskaźnikiem reagującym na zmiany stężenia tlenu w pożywce (zmniejszenie stężenia związane z tlenowym metabolizmem bakterii). Podobnie jak w poprzednim systemie, pomiar dokonywany jest w sposób ciągły, a część pomiarowa jest integralną częścią komory inkubacyjnej. Zasadniczą różnicą jest sposób detekcji mierzonego parametru – w tym systemie mierzy się zmianę fluorescencji (23).

Prekursorem obu wymienionych systemów był system hodowlany Bactec 460 TB z radiometrycznym pomiarem stężenia dwutlenku węgla jako produktu metabolizmu bakterii (24). Ze względu na wykorzystywane w tym systemie podłoża zawierające substraty znakowane izotopem węgla C-14 jest on sukcesywnie

wycofywany z użycia i zastępowany bezpieczniejszymi dla środowiska systemami MB/BacT oraz MGIT.

Zastosowanie systemów automatycznych pozwoliło na znaczące skrócenie czasu potrzebnego do uzyskania wzrostu prątków, co potwierdzają wyniki Sorlozano i wsp. przedstawione w tabeli 1. (25)

| Prątki | Czas wykrycia: średnio dni \pm SD | | |
|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-----------------|
| | L-J | MB/BacT | MGIT 960 |
| Wszystkie | 32,4 \pm 11,9 | 20,2 \pm 9,0 | 15,1 \pm 6,4 |
| <i>M. tuberculosis complex</i> | 32,6 \pm 11,8 | 20,1 \pm 8,6 | 15,3 \pm 6,1 |
| <i>M. chelonae</i> | 21,6 \pm 5,3 | 12,0 (tylko 1 izolat) | 12,6 \pm 0,5 |
| <i>M. kansasii</i> | 29,8 \pm 10,8 | 19,2 \pm 13,0 | 12,0 \pm 5,6 |
| <i>M. fortuitum</i> | 49,5 \pm 0,7 (tylko 2 izolaty) | 44,0 (tylko 1 izolat) | 20,3 \pm 18,9 |
| <i>M. goodii</i> | 43,0 \pm 9,9 | nie wykryto | nie wykryto |
| <i>M. marinum</i> | 19,0 (tylko 1 izolat) | nie wykryto | nie wykryto |

Tab. 1. Średni czas wzrostu prątków w różnych systemach hodowlanych (L-J - klasyczna hodowla na podłożu Loewensteina-Jensena) (25).

Również częstość izolacji prątków w przypadku hodowli w systemach automatycznych jest znacząco wyższa niż w przypadku konwencjonalnych hodowli na podłożach stałych (25, 26).

Należy pamiętać, że każdemu zleceniu badania materiału klinicznego metodą bakterioskopii powinno towarzyszyć zlecenie wykonania hodowli. Metoda hodowli jest znacznie czulsza niż bakterioskopia i umożliwia wykrycie prątków występujących w materiale klinicznym już w ilościach 10 – 100 komórek/ml (16). Poza tym tylko hodowla umożliwia uzyskanie kultury bakteryjnej, która pozwoli na identyfikację gatunkową oraz określenie wrażliwości na leki przeciwpłatkowe.

1.2.2. Diagnostyka metodami biologii molekularnej

Zastosowanie technik amplifikacji kwasów nukleinowych mikobakterii znacznie zwiększyło możliwości mikrobiologicznej diagnostyki gruźlicy. Ta najmłodsza gałąź technik stosowanych w mikrobiologii prętka gruźlicy (pierwsze prace na temat stosowania technik amplifikacji DNA prętka gruźlicy w materiałach klinicznych pochodzą z końca lat 80-tych XX wieku) rozwija się niezwykle dynamicznie (27). Rozwój technik molekularnych doprowadził do powstania metod umożliwiających potwierdzenie, z bardzo dużą czułością i swoistością, obecności prątków w badanym materiale klinicznym już w ciągu 1-2 dni.

W zakresie klinicznej diagnostyki gruźlicy metodami amplifikacji kwasów nukleinowych stosunkowo wcześniej zaczęło obowiązywać ograniczenie nałożone przez Światową Organizację Zdrowia dotyczące systemów diagnostycznych typu „*home-made*”. W roku 1998 organizacja ta rekomendowała, aby badania molekularne materiałów klinicznych na obecność materiału genetycznego *Mycobacterium tuberculosis* wykonywać wyłącznie w zamkniętych, komercyjnie dostępnych systemach genetycznych, wyposażonych w kontrole procesów amplifikacji (28). Obecnie w Polsce najpowszechniej stosowane są dwa tego rodzaju systemy:

ProbeTec (Becton Dickinson)

W systemie tym wykorzystywany jest proces SDA (*Strand Displacement Amplification*). Jest to proces izotermalny, w którym amplifikacja odbywa się w połączeniu z jednoczesnym wykrywaniem amplifikowanego materiału. Sekwencją docelową jest sekwencja insercyjna IS 6110 – fragment DNA charakterystyczny dla *Mycobacterium tuberculosis* complex. System posiada wewnętrzną kontrolę amplifikacji, pozwalającą na wykrywanie inhibitorów tego procesu znajdujących się w badanym materiale. Enzymy wykorzystywane w reakcji SDA to polimeraza DNA oraz enzym restrykcyjny (29).

MTD (Gen Probe)

Amerykańska firma Gen Probe opracowała metodę amplifikacji kwasów nukleinowych nazwaną TMA (*Transcription Mediated Amplification*). TMA jest procesem izotermalnym. W tej metodzie amplifikacji ulega sekwencja rybosomalnego kwasu rybonukleinowego. Detekcja amplifikowanego materiału genetycznego odbywa się przy pomocy sond znakowanych estrem akrydynowym. Sondy, które uległy hybrydyzacji z produktem procesu TMA emitują sygnał chemiluminescencyjny, który jest mierzony przez luminometr. Stosowane w procesie TMA enzymy to: odwrotna transkryptaza oraz polimeraza RNA. Zastosowanie rRNA prątków jako obiektu docelowego sondy okazało się metodą bardzo czułą, gdyż występuje on w komórce bakteryjnej w tysiącach kopii (30, 31).

Obecnie znaczenie zyskują systemy wykorzystujące technologię real-time PCR. Zastosowanie takich systemów umożliwia ilościową ocenę ilości prątków w badanym materiale klinicznym. Jednym z najnowszych produktów tego typu jest system GeneXpert. W systemie tym, w przypadku wykrycia materiału genetycznego

prątka, równocześnie identyfikowane jest występowanie mutacji odpowiedzialnej za oporność na rifampicynę – podstawowy lek przeciwprątkowy (32).

Diagnostyka molekularna weszła na stałe do zestawu metod diagnostyki laboratoryjnej gruźlicy. Zostało to jednoznacznie usankcjonowane zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia. Zaleca ona, by amplifikacyjnym testem genetycznym potwierdzać wszystkie przypadki dodatniej bakterioskopii. Takie postępowanie umożliwia bardzo szybkie potwierdzenie przynależności obserwowanych w preparacie bezpośrednim form kwasoopornych do kompleksu *Mycobacterium tuberculosis*, a także w przypadku stosowania zaawansowanych systemów pozwala na określenie wrażliwości prątków na leki przeciwprątkowe poprzez identyfikację mutacji w genie *rpoB* odpowiedzialnych za tę oporność. O randze jaką Światowa Organizacja Zdrowia nadaje molekularnej diagnostyce gruźlicy świadczy to, że promuje ona systemy praktycznie bezobsługowe i zaleca ich wprowadzanie do laboratoriów o niższych poziomach referencyjności (33).

1.2.3. Diagnostyka histologiczna

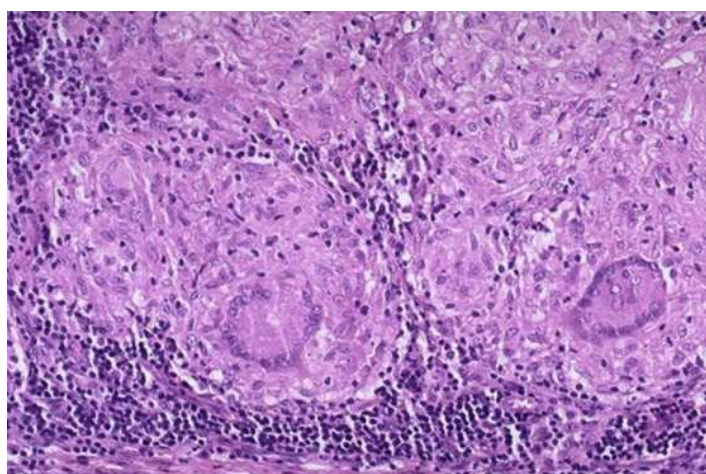
Rolę badania histologicznego w diagnostyce gruźlicy potwierdza fakt zrównania jej znaczenia z badaniem bakteriologicznym poprzez umieszczenie jej w opisie jednostki chorobowej zastosowanym w Międzynarodowej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych ICD-10 (34). Klasyfikacja ta opisuje grupę A-15 jako „*gruźlicę układu oddechowego, bakteriologicznie i histologicznie potwierdzoną*”.

Ten rodzaj diagnostyki posiada pewne ograniczenia:

- materiał do przeprowadzenia badania metodami histologicznymi pobierany jest w sposób inwazyjny (w trakcie zabiegu operacyjnego lub biopsji);

- badanie nie dostarcza materiału (namnożonego szczepu bakteryjnego) koniecznego do przeprowadzenia identyfikacji gatunkowej szczepu oraz oznaczenia jego lekowrażliwości.

Nie zmienia to jednak faktu, że ta metoda rozpoznawania etiologii zmian w tkance płuc posiada wysoką, porównywalną z badaniami mikrobiologicznymi czułość i swoistość (35). Niektórzy autorzy wnioskuje, że dla uzyskania optymalnego wyniku z uzyskanego materiału należy wykonać równoległe posiew (36, 37). Zakażona prątkiem gruźlicy tkanka ulega charakterystycznym zmianom. Mikroskopowy obraz tych zmian pozwala na postawienie rozpoznania gruźlicy. Histologicznie miejsca aktywnego rozwoju naznaczone są charakterystyczną zapalną reakcją ziarniniakową, w której tworzą się zarówno serowaciejące, jak i nieserowaciejące gruzelki. Pojedyncze gruzelki są mikroskopowej wielkości; dopiero gdy nastąpi zlewanie się licznych gruzelków, stają się one widoczne makroskopowo. Gruzelki otacza zwykle pierścień fibroblastów przerywany naciekiem limfocytów. W gruzelkach stwierdza się wielojądrowe komórki olbrzymie (38).



Rys. 4. Obraz mikroskopowy wielojądrzastej komórki olbrzymiej i ziarniniaka gruźliczego (39).

1.2.4. Immunologiczne metody diagnostyczne w gruźlicy

1.2.4.1. Metody oparte na badaniu odpowiedzi humoralnej

Odpowiedź immunologiczna w gruźlicy jest typowym przykładem odpowiedzi komórkowej (40, 41). Z tego względu diagnostyka serologiczna, polegająca na poszukiwaniu we krwi przeciwciał produkowanych przez układ immunologiczny w odpowiedzi na zakażenie prątkiem, ma marginalne znaczenie w diagnostyce gruźlicy. Pomimo tego, że badania nad wykorzystaniem reakcji antygen – przeciwciało rozpoczęto już pod koniec XIX wieku badaniami Arloinga (42) i trwały one przez cały wiek XX, nie doczekano się testu wykazującego w pełni satysfakcjonujące parametry. Stosowany w pracach Arloinga tzw. „szczep jednolity” dający równomierne zmętnienie bulionu miał reagować z przeciwciałami przeciwprątkowymi, a wynikiem tej reakcji miała być aglutynacja. Reakcja ta przy wysokiej czułości charakteryzowała się bardzo niską swoistością. W następnych dziesięcioleciach próbowano praktycznie użyć wielu różnych antygenów. W chwili obecnej pewne znaczenie praktyczne posiadają antygeny 38 kDa, A-60 i LAM (43, 44). Na bazie tych antygenów produkowane są dostępne komercyjnie testy (zarówno w postaci testów ELISA jak i prostych i szybkich w wykonaniu testów immunochromatograficznych). Czułość tych testów szacowana jest jednakże zaledwie na 31-69% w zależności od fazy choroby (1). Na chwilę obecną wydaje się, że ten rodzaj diagnostyki stanowi „ślepą uliczkę” w diagnostyce czynnych postaci gruźlicy. Pewne nadzieje można natomiast wiązać z wykorzystaniem izolowanych antygenów prątkowych w badaniach odporności humoralnej stymulowanej szczepieniami zarówno BCG oraz projektowanych atenuowanych szczepionek przeciw gruźlicy (45, 46).

1.2.4.2. Metody oparte na badaniu odpowiedzi komórkowej

Tuberkulinowy odczyn skórny

W roku 1964 Mackaness (47) wykazał w sposób jednoznaczny, że odporność na zakażenie prątkiem gruźlicy oraz niektórymi innymi wewnątrzkomórkowymi patogenami bakteryjnymi ma charakter odporności typu komórkowego. Umożliwiło to ostateczne wyjaśnienie mechanizmu tuberkulinowego odczynu skórniego stosowanego od początku XX wieku. Jakkolwiek podział mechanizmów obrony przed zakażeniem (na odporność humoralną i komórkową) był znany dużo wcześniej, to nie rozumiano istoty zjawiska. Oto jeszcze w roku 1948 w rozdziale publikacji nt. gruźlicy dotyczącym udziału odporności komórkowej w reakcji na zakażenie prątkiem czytamy:

„Czy jednak udział komórek krążących we krwi albo tkankowych, ma pewne znaczenie w zwalczaniu prątków przez ustrój? Otóż krótko powiedziawszy, nie znamy takiego odczynu komórkowego, który by można uważać za wyraz obrony czy odporności ustroju. Udział mikrofagów (sic!) , a więc granulocytów w pochłanianiu prątków jest duży, ale znaczenie jego polega może raczej na roznoszeniu prątków w ustroju i powstawaniu w ten sposób przerzutów drogą krwi.” (19)

Tuberkulinowy odczyn skórny zaproponowany został w różnych postaciach, niemal równocześnie przez trzech badaczy: Clemensa von Pirqueta (1907), Charlesa Mantoux (1908) oraz Ernsta Moro (1908) (19). Technika zaproponowana przez Pirqueta polegała na skaryfikacji w miejscu podania tuberkuliny. Moro stosował wcieranie maści zawierającej tuberkulinę. Niewątpliwie najlepszym i do dnia dzisiejszego stosowanym sposobem podania tuberkuliny jest zaproponowane przez Mantoux śródskórne wstrzyknięcie tuberkuliny. W przypadku każdego z testów

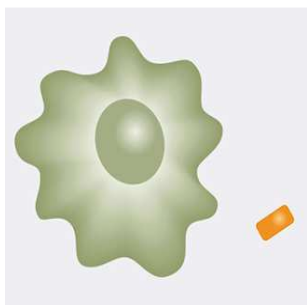
obserwowano wystąpienie reakcji zapalnej w miejscu podania tuberkuliny jako odpowiedzi na wcześniejszy kontakt osoby badanej z prątkiem gruźlicy. Reakcja ta ma charakter nadwrażliwości typu opóźnionego (48). Przez dziesięciolecia test Mantoux był jedynym dostępnym testem umożliwiającym ocenę stanu zakażenia organizmu prątkiem, spełniając również pomocniczą rolę w diagnostyce aktywnych postaci gruźlicy. Metoda ta nie była wolna od wad. Podstawową wadą jest stosowanie tuberkuliny, będącej mieszaniną niezdefiniowanych dokładnie antygenów reagujących krzyżowo z antygenami szczepu BCG (49). Stosowana dziś tuberkulina referencyjna RT23 (Statens Serum Institut, Kopenhaga) również nie jest wolna od wszystkich wad jakie miały jej stare wersje. Jest to przyczyna, dla której interpretacja wyników tego testu w populacjach szczepionych szczepionką BCG może być obarczona dużym stopniem niepewności. Doniesienia dotyczące swoistości tuberkulinowego odczynu skórniego w tych populacjach są sprzeczne (50, 51, 52, 53). W badaniu przeprowadzonym na polskiej grupie osób szczepionych wielokrotnie Gruszczyński i Ozorowski wykazali, że nie występuje statystycznie istotna różnica w rozkładzie wyników skórniego odczynu tuberkulinowego pomiędzy osobami zdrowymi, bez uprzedniego kontaktu z osobami chorymi na gruźlicę, a osobami chorymi na gruźlicę. Przyjęcie wielkości nacieku, która dyskryminowała obie grupy w sposób statystycznie istotny – 19 mm – powodowało z kolei, że test wykazywał czułość niespełna 24% (54).

Testy uwalniania interferonu gamma

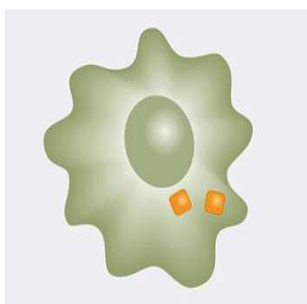
Opisanych powyżej wad pozbawione są testy uwalniania interferonu gamma (IGRA). Testy IGRA są testami *in vitro* służącymi do oceny zakażenia organizmu drobnoustrojem (w tym przypadku prątkiem gruźlicy), który indukuje odpowiedź komórkową. Poziom tej odpowiedzi jest mierzony ilością uwalnianego przez limfocyty

interferonu gamma. Uzyskanie wysokiej specyficzności możliwe jest w tej metodzie dzięki zastosowaniu do indukcji odpowiedzi antygenów specyficznych dla kompleksu *Mycobacterium tuberculosis* z wyjątkiem *Mycobacterium bovis* BCG. Stosowane antygeny nie reagują również z większością szczepów prątków niegruźliczych (wyjątkiem są: *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*). Antygeny te zostały zidentyfikowane metodami inżynierii genetycznej na początku lat 90-tych XX wieku jako produkt regionu RD1 genomu prątka (55). Region ten nie występuje zaś w szczepie BCG oraz w szczepach niegruźliczych (z wyjątkiem wyżej wymienionych). Antygeny te to ESAT-6 (Early Secretory Antigenic Target 6) (56) oraz CFP-10 (Culture Protein Filtrate 10) (57). W teście najnowszej generacji, dla zwiększenia jego specyficzności używa się równocześnie trzeciego antygeny: TB7.7(p4), który jest produktem regionu RD11 (55).

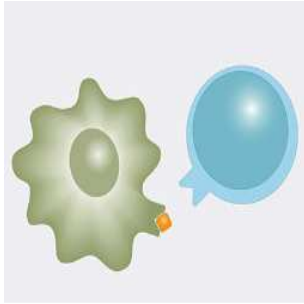
Zasada metody IGRA (58)



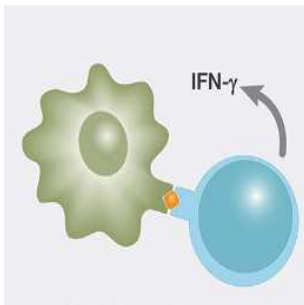
Do próbki krwi heparynizowanej dodaje się w warunkach *in vitro* antygeny: ESAT-6, CFP-10 oraz ewentualnie TB7.7(p4). Dochodzi do kontaktu antygenów oraz komórek prezentujących antygen (APC).



Antygeny zostają pochłonięte i przetworzone przez komórki APC.



Następuje prezentacja epitopów antygeny limfocytom T.



Aktywowany limfocyt T wydziela cytokiny, wśród nich interferon gamma.

Proces uwalniania interferonu gamma może być monitorowany w dwojaki sposób: bądź poprzez pomiar jego stężenia metodą ELISA (komercyjna forma testu: QuantiFERON-TB Gold In Tube; Cellestis), bądź poprzez określenie liczby limfocytów uwalniających interferon gamma metodą ELISPOT (komercyjna forma testu: T-Spot.TB; Oxford Immunotec) (58).

Testy IGRA zostały opracowane głównie z myślą o wykrywaniu latentnego zakażenia prątkiem gruźlicy, jako czulsza i bardziej swoista alternatywa tuberkulinowego odczynu skórniego. Znalazło to odbicie w rekomendacjach jakie ukazały się w ostatnich latach (59, 60, 61, 62). Główne obszary zastosowań testów IGRA to:

- badanie osób po kontakcie z chorymi na czynną gruźlicę (63 - 67)
- badanie osób narażonych zawodowo na zakażenie prątkiem gruźlicy (68 – 72)
- badanie kandydatów do terapii biologicznych (73 – 78)
- badanie osób z pierwotnymi i wtórnymi niedoborami odporności (79 – 81).

Obserwuje się trzy różne sposoby podejścia do stosowania testów IGRA w diagnostyce pacjentów w wyżej wymienionych obszarach:

- równoczesne wykonywanie testu IGRA i tuberkulinowego odczynu skórniego (62);
- weryfikowanie dodatnich wyników tuberkulinowego odczynu skórniego testem IGRA (61);
- dopuszczenie testów IGRA do stosowania we wszystkich obszarach, w których do tej pory stosowano tuberkulinowy odczyn skórny (59).

Jednocześnie od samego niemal początku stosowania testów IGRA podejmowano próby użycia ich jako testów służących diagnostyce aktywnych postaci gruźlicy (82 – 89). Stosunek różnych autorów do tego zagadnienia dobrze ilustruje tytuł w formie pytania artykułu zamieszczonego w *European Respiratory Journal*: *Interferon- γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: sensible or silly?* (90). Między tymi skrajnymi opcjami mieszczą się bowiem odpowiedzi na to pytanie. Związane jest to ze znacznym rozrzutem wartości czułości uzyskanych w badaniach różnych autorów: od 58% (91) do 100% (92) dla testu QuantiFERON-TB Gold In Tube oraz od 50% (93) do 100% (94) dla testu T-Spot. Obliczona w metaanalizie Diela i wsp. (95) średnia czułość testu IGRA w wykrywaniu aktywnych postaci gruźlicy wynosiła 81% (95% CI: 78-83%) dla testu QuantiFERON-TB Gold In Tube oraz 87,5% (95% CI: 85-90%) dla testu T-Spot. Taka rozbieżność nasuwa wniosek o konieczności dokonania oceny przydatności testu do diagnozowania aktywnych postaci gruźlicy każdorazowo dla populacji, w której test ma być stosowany (87). Na podstawie teoretycznych rozważań można oczekiwać, że znalezienie innych, bardziej specyficznych, cytokin spowoduje zwiększenie czułości i swoistości testu opartego na pomiarze uwalniania takich

cytokin pod wpływem stymulacji specyficznymi antygenami prątka. Być może uda się wówczas również różnicować zakażenia pierwotne od przebytych oraz latentne zakażenie prątkiem od czynnej postaci gruźlicy.

2. Cel pracy

Celem pracy jest określenie miejsca i znaczenia testu QuantiFERON-TB Gold In Tube w schematach diagnostycznych rozpoznawania zakażeń prątkiem *Mycobacterium tuberculosis* w aktywnej postaci gruźlicy płuc.

Cel ten zrealizowano przez:

- 1. Analizę statystyczną wyników testu QuantiFERON-TB Gold In Tube w odniesieniu do „złotego standardu” w diagnozowaniu aktywnych postaci gruźlicy, jakim jest wynik badań mikrobiologicznych;**
- 2. Określenie optymalnych dla badanej populacji punktów odcięcia różnicujących grupę wyników dodatnich i ujemnych testu;**
- 3. Analizę przydatności pomiaru elementów składowych testu do różnicowania etiologii chorób płuc.**

3. Materiał i metody

3.1. Charakterystyka badanej populacji

Badaniem objęto 979 pacjentów w wieku powyżej 18 lat, w tym 381 kobiet i 598 mężczyzn, podejrzanych o występowanie gruźlicy i hospitalizowanych w Wielkopolskim Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w okresie od stycznia 2006 roku do maja 2010 roku. Charakterystykę demograficzną badanej populacji przedstawiono w tabeli 2. W toku prowadzonej rutynowo diagnostyki różnicowej wykonano u nich badania mikrobiologiczne oraz test Quantiferon-TB Gold in tube.

| płeć | n (%) | wiek (min. – max.) | mediana | średni wiek (w latach) |
|-----------|-------------|-----------------------|---------|---------------------------|
| Kobiety | 381 (38,9%) | 18 – 91 | 58,0 | 56,6 ±16,6 |
| mężczyźni | 598 (61,1%) | 18 - 88 | 55,2 | 54,9 ± 15,8 |

Tabela 2 . Charakterystyka demograficzna badanej populacji.

Ze względu na postawione rozpoznanie na potrzeby badania pacjentów podzielono zgodnie z Międzynarodową Klasyfikacją Chorób i Problemów Zdrowotnych ICD-10 na następujące grupy (34):

- grupa pacjentów z definitywnym rozpoznaniem gruźlicy płuc – rozpoznanie A-15 (przypadki potwierdzone dodatnim wynikiem hodowli prątków *M. tuberculosis* i/lub dodatnim wynikiem badania genetycznego i/lub rozpoznaniem histopatologicznym);

- grupa pacjentów z gruźlicą rozpoznaną jedynie na podstawie objawów klinicznych bez potwierdzenia w badaniach laboratoryjnych – rozpoznanie A-16;
- grupa pacjentów z innymi chorobami płuc, u których po przeprowadzeniu badań diagnostycznych gruźlicę wykluczono. W toku dalszej diagnostyki rozpoznano u nich następujące jednostki chorobowe: zapalenie płuc wywołane drobnoustrojem innym niż *M. tuberculosis*, nowotwory płuc, sarkoidozę. Dla istoty niniejszej pracy analiza częstości występowania tych rozpoznań nie jest konieczna.

Zgodę na przeprowadzenie badania według zastosowanego protokołu wydała Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (Uchwała nr 200/08).

3.2. Zakres badań

3.2.1. Badania mikrobiologiczne

Wszyscy pacjenci włączeni do badania mieli wykonywaną pełną diagnostykę mikrobiologiczną gruźlicy, prowadzoną zgodnie ze zleceniami lekarza prowadzącego.

Materiałami do badań mikrobiologicznych były:

- plwocina
- popłuczyny oskrzelowe
- płyn z jam opłucnej
- tkanka płuca

Plwocina pobierana była do badania rano, do jałowych pojemników o szerokim wylocie, po wykonaniu zabiegów higienicznych w obrębie jamy ustnej. Pacjent był

instruowany o konieczności odkrztuszenia płwociny i unikaniu, w miarę możliwości, dodawania śliny do pojemnika. Ilość pobranej płwociny – 2 do 5 ml. Pojemnik natychmiast szczelnie zamykano i przekazywano do laboratorium mikrobiologicznego.

Popłuczyny oskrzelowe pobierano do badania w trakcie zabiegu bronchofiberoskopii. Płukanie wykonywano przy użyciu 250 ml soli fizjologicznej. Dla celów diagnostyki mikrobiologicznej pobierano z odzyskanego materiału bezpośrednio do jałowej probówki typu Falcon 50 ml popłuczyn. Probówkę natychmiast szczelnie zamykano i przekazywano do laboratorium mikrobiologicznego (96).

Płyn z jamy opłucnej pobierano w trakcie nakłucia odbarczającego bezpośrednio do jałowych probówek typu Falcon o pojemności 50 ml. Ilość pobranego materiału – 20 - 200 ml. Probówkę (probówki) natychmiast szczelnie zamykano i przekazywano do laboratorium mikrobiologicznego.

Fragmenty tkanki płuca do badania mikrobiologicznego pobierano w trakcie zabiegów operacyjnych. Pobraną tkankę umieszczano w jałowym naczyniu bez dodatku substancji zabezpieczających i przekazywano do laboratorium mikrobiologicznego.

Wszystkie materiały do czasu wykonania badania przechowywano w temperaturze +4°C.

Badanie mikrobiologiczne obejmowało we wszystkich przypadkach:

- opracowanie (homogenizację) materiału
- ocenę preparatu bezpośredniego w kierunku prątków kwasoopornych
- hodowlę w kierunku prątków kwasoopornych

W wybranych przez lekarza prowadzącego przypadkach wykonywano badanie genetyczne metodą amplifikacji rRNA.

W przypadku wyhodowania prątków kwasoopornych badanie obejmowało identyfikację prątków.

3.2.1.1. Opracowanie materiału klinicznego do badania mikrobiologicznego (97)

Materiał uzyskany w objętości mniejszej niż 10 ml poddawano homogenizacji bez wstępnego zagęszczania. Materiały o większych objętościach poddawano wstępnemu zagęszczeniu za pomocą wirowania. Warunki wirowania: przyspieszenie 3000 g, czas wirowania 30 minut, temperatura +4°C. Supernatant zlewano do płynu antyseptycznego. Osad pozostawiony w objętości 5 – 10 ml poddawano homogenizacji. Materiały operacyjne homogenizowano wstępnie mechanicznie. W tym celu materiał rozdrabniano używając skalpela a następnie tak rozdrobnione fragmenty miażdżono w szklanym homogenizatorze mikrobiologicznym.

Do homogenizacji używano mieszaniny uzyskiwanej przez zmieszanie równych objętości 4% jałowego roztworu wodorotlenku sodowego i 2,9% jałowego roztworu cytrynianu sodowego. Do tak sporządzonej mieszaniny dodawano w sposób aseptyczny N-acetylo-L-cysteinę w ilości 0,1 g/100 ml.

Homogenizację prowadzono dodając do badanego materiału równoobjętościową ilość mieszaniny homogenizującej, pozostawiając całość na 20 minut po dokładnym wymieszaniu na mieszadle typu Vortex.

Po tym czasie uzupełniano mieszaninę wodą destylowaną do objętości całkowitej 50 ml i po wymieszaniu wirowano w warunkach j.w.

Supernatant dokładnie zlewano z nad osadu, a osad zawieszano w 2 ml buforu fosforanowego o stężeniu 67 mM i pH 6,8. Tak uzyskany osad używano do badań mikrobiologicznych.

3.2.1.2. Ocena preparatu bezpośredniego w kierunku prątków kwasoopornych

Do rutynowej oceny preparatów bezpośrednich wykorzystywano metodę auraminową i obserwację preparatów w mikroskopie fluorescencyjnym w powiększeniu 400x. Preparaty dodatnie względnie wątpliwe potwierdzano stosując klasyczną metodę Ziehl-Neelsena i obserwację w mikroskopie optycznym w powiększeniu 1000x.

3.2.1.3. Hodowla w kierunku prątków kwasoopornych

Wszystkie zhomogenizowane uprzednio materiały posiewano na podłoża Loewenstein-Jensen w duplikacie używając po 0,2 ml homogenatu na podłoże. Podłoża inkubowano przez 10 tygodni w temperaturze 37°C. Podłoża sprawdzano co tydzień. W przypadku stwierdzenia wzrostu kolonii bakteryjnych na podłożu wykonywano preparat bezpośredni barwiony metodą Ziehl-Neelsena. Stwierdzając wzrost bakterii kwasoopornych wykonywano przesiew bakterii dla uzyskania kultury do przeprowadzenia testu niacynowego. Dodatni wynik testu niacynowego potwierdzał przynależność wyhodowanych prątków do gatunku *M. tuberculosis* (98).

Homogenaty popłuczyn oskrzelowych oraz płynów z jamy opłucnej posiewano dodatkowo na podłoża płynne BacT/AlerT MP (bioMerieux) i inkubowano w automatycznym systemie hodowlanym MB/BacT. Hodowla sygnalizowana przez system jako dodatnia była weryfikowana na obecność prątków kwasoopornych

preparatem barwionym metodą Ziehl-Neelsena. Ostateczną weryfikację przeprowadzano wykonując test niacynowy.

3.2.2. Badania genetyczne (99)

Genetyczną diagnostykę gruźlicy prowadzono wykorzystując zamknięty system diagnostyczny firmy Gen-Probe Inc. W badaniach stosowano zestaw diagnostyczny MTD 2. Zawarte w zestawie odczynniki służą do przeprowadzenia detekcji specyficznych dla *Mycobacterium tuberculosis* complex sekwencji rybosomalnego kwasu rybonukleinowego metodą TMA (*Transcription-Mediated Amplification*).

Badanie w systemie TMA składa się z trzech etapów: przygotowanie próbek, amplifikacja i detekcja.

3.2.2.1. Przygotowanie próbek

Aby uwolnić kwasy nukleinowe do mieszaniny reakcyjnej, konieczne jest rozbicie komórek mikroorganizmów. Dokonuje się tego przy pomocy ultradźwięków w sonikatorze. Następnie mieszanina reakcyjna ogrzewana jest przez 15 minut w temperaturze 95°C w celu denaturacji kwasów nukleinowych i inaktywacji czynników infekcyjnych. Tak przygotowany lizat zawiera kwasy nukleinowe, które służą jako matryca do replikacji *in vitro*.

3.2.2.2. Amplifikacja

System TMA wykorzystuje dwa primery i dwa enzymy: polimerazę RNA i odwrotną transkryptazę. Jeden z primerów zawiera sekwencję promotorową dla

polimerazy RNA (starter-promotor). W pierwszym etapie amplifikacji starter-promotor łączy się z rRNA w ściśle określonym miejscu. Odwrotna transkryptaza syntetyzuje kopię DNA z rRNA poprzez wydłużanie od końca 3' startera-promotora. W rezultacie tworzy się hybryda RNA:DNA, w której RNA jest degradowane dzięki aktywności RNAzy odwrotnej transkryptazy. Drugi primer przyłącza się do uwolnionej kopii DNA. Komplementarna nić DNA jest syntetyzowana dzięki aktywności odwrotnej transkryptazy. Razem tworzą podwójną nić DNA. Polimeraza DNA rozpoznaje sekwencję promotorową na matrycy DNA i rozpoczyna transkrypcję. Każda z nowo zsyntetyzowanych cząsteczek RNA ponownie podlega procesowi TMA, co prowadzi do wykładniczego wzrostu liczby cząsteczek RNA. Proces odbywa się w suchej łaźni w temperaturze 42°C w ciągu 30 – 60 minut.

3.2.2.3. Detekcja

Detekcja kopii RNA wyprodukowanych w reakcji TMA odbywa się poprzez dodanie do prób sond DNA znakowanych za pomocą estru akrydynowego. Cząsteczki sondy, które uległy hybrydyzacji dają sygnał chemiluminescencyjny, natomiast chemiluminescencja cząsteczek niezwiązanych jest wygaszona. Pomiaru luminescencji dokonywano w luminometrze Leader 50i. Za dodatnie uznawano próby, których luminescencja była większa niż 500.000 RLU.

3.2.3. Badanie histologiczne (100)

Badania histologiczne materiałów tkankowych pobieranych śródoperacyjnie wykonywano w Zespole Akademickich Patologów sp. z o.o. Skrawki poddawano barwieniu H + E. Gruźliczy charakter zmian w badanych tkankach rozpoznawano na podstawie charakterystycznego obrazu ziarniny gruźliczej.

3.2.4. Test QuantiFERON-TB Gold in tube (101)

Test QFT przeprowadza się w dwóch etapach.

W etapie pierwszym pobierano pełną krew żylną w ilości po $1 \pm 0,2$ ml do każdej z trzech probówek zestawu, tj. do probówki z próbą ślepą (NIL Control), probówki opłaszczonej antygenami prątka (TB Antigen) i probówki z mitogenem (Mitogen).

Probówki zawierające krew po intensywnym wytrząśnięciu poddawano inkubacji w temperaturze 37°C tak szybko, jak to tylko możliwe, przy czym nie później niż po 16 godzinach od momentu pobrania krwi. Po okresie inkubacji trwającym 16 – 24 godzin zawartość probówek odwirowywano (3000g/10 minut) i oddzielano osocze, które do momentu przeprowadzenia pomiarów przechowywano w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$.

W drugim etapie oznaczano przy pomocy techniki ELISA stężenie interferonu gamma w każdej z trzech probówek zestawu.

W poszczególnych probówkach oznaczano następujące parametry:

- NIL – stężenie endogennego interferonu-gamma;
- TB Antigen – stężenie interferonu-gamma uwalnianego przez limfocyty T po stymulacji antygenami prątka;
- MITOGEN – stężenie interferonu-gamma uwalnianego przez limfocyty T po stymulacji mitogenem - fitohemaglutyniną (ocena sprawności układu odpowiedzi komórkowej osoby badanej).

Oznaczenie wykonywano używając odczynników, które są częścią komercyjnego zestawu QuantiFERON[®]-TB Gold In tube (Cellestis) postępując dokładnie według instrukcji producenta. Pomiaru dokonywano na czytniku Humareader (Human), stosując filtr 450 nm oraz filtr referencyjny 620 nm.

Otrzymane wyniki gęstości optycznej wprowadzano do programu komputerowego, który dokonywał kontroli jakości testu, obliczał wyniki ilościowe wyrażone w jednostkach międzynarodowych interferonu gamma w 1 mililitrze surowicy (I.U./ml), oraz interpretował je jakościowo, przyporządkowując do kategorii wyników dodatnich, ujemnych bądź nieokreślonych. Interpretacja odbywała się zgodnie z algorytmem przedstawionym w tabeli 3.

| NIL (I.U./ml) | TB Antigen minus NIL (I.U./ml) | Mitogen minus NIL (I.U./ml) | Wynik testu QuantiFERON-TB Gold | Interpretacja |
|---------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|---|
| ≤8,0 | <0,35 | ≥0,5 | UJEMNY | Zakażenie <i>M. tuberculosis</i> mało prawdopodobne |
| | ≥0.35 i <25% wartości NIL | ≥0,5 | | |
| | ≥0.35 i ≥ 25% wartości NIL | każda wartość | DODATNI | Wysoce prawdopodobne zakażenie <i>M. tuberculosis</i> |
| | <0,35 | <0,5 | NIEOKREŚLONY | Wynik nieokreślony ze względu na wysoki poziom endogennego interferonu-gamma lub brak odpowiedzi na stymulację mitogenem |
| ≥0.35 i <25% wartości NIL | <0,5 | | | |
| >8,0 | każda wartość | każda wartość | | |

Tab. 3. Kryteria interpretacyjne testu QuantiFERON-TB Gold In Tube.

3.3. Opracowanie statystyczne

W celu obliczenia parametrów statystycznych testu: czułości, swoistości, dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej, analizie poddano grupy pacjentów z definitywnym (potwierdzonym laboratoryjnie) rozpoznaniem gruźlicy oraz grupę pacjentów, którym postawiono rozpoznanie inne niż gruźlica. Z analizy wykluczono pacjentów, u których gruźlicę rozpoznano na podstawie objawów klinicznych, nie uzyskując mikrobiologicznego potwierdzenia gruźlicy. Postępowanie takie jest uzasadnione wobec faktu, że rozpoznanie mikrobiologiczne jest w niniejszym badaniu uznane za punkt odniesienia dla oceny testu QFT.

Parametry testu obliczono dla różnych wariantów analitycznych. Wyniki testu QFT pacjentów podzielono na grupy reprezentujące następujące kategorie:

- prawdziwie dodatnie (TP) – dodatni wynik testu QFT u pacjentów z potwierdzoną mikrobiologicznie lub histologicznie gruźlicą płuc;
- prawdziwie ujemne (TN) – ujemny wynik testu QFT u pacjentów z rozpoznaniem innym niż gruźlica płuc;
- fałszywie dodatnie (FP) – dodatni wynik testu QFT u pacjentów z rozpoznaniem innym niż gruźlica płuc;
- fałszywie ujemne (FN) – ujemny wynik testu QFT u pacjentów z potwierdzoną mikrobiologicznie lub histologicznie gruźlicą płuc.

W związku z istnieniem kategorii „nieokreślonego” wyniku testu QFT przyjęto następującą klasyfikację:

- Wynik „nieokreślony” testu QFT traktowany jako ujemny, tylko wynik dodatni testu QuantiFERON-TB Gold In Tube potwierdza rozpoznanie aktywnej postaci gruźlicy płuc. W takim schemacie QFT traktowany jest jako test potwierdzający rozpoznanie gruźlicy płuc;
- Wynik „nieokreślony” testu QFT traktowany jako dodatni, tylko wynik ujemny testu QuantiFERON-TB Gold In Tube wyklucza rozpoznanie

aktywnej postaci gruźlicy płuc. W takim schemacie QFT traktowany jest jako test wykluczający rozpoznanie gruźlicy płuc.

Utworzono również teoretyczną formułę wykorzystującą do celów diagnostycznych równocześnie wynik testu QFT oraz bakterioskopii (AFB). W takim schemacie zastosowano następujący algorytm kwalifikowania wyników tych testów jako potwierdzających lub wykluczających rozpoznanie gruźlicy płuc:

- QFT + AFB jako testy potwierdzające:
gruźlicę płuc potwierdza dodatni wynik przynajmniej jednego z dwóch następujących badań: testu QFT i/lub preparatu bezpośredniego (AFB). Wynik „nieokreślony” testu QFT traktowany jest jako ujemny;
- QFT + AFB jako testy wykluczające:
gruźlicę płuc wykluczają jedynie ujemne wyniki obydwu badań: testu QFT oraz preparatu bezpośredniego (AFB). Wynik „nieokreślony” testu QFT traktowany jest jako dodatni;

Dla oceny istotności różnic parametrów ilościowych testu QFT stosowano test U Manna-Whitneya. Test ten jest nieparametrycznym testem do sprawdzenia czy wartości próbek pobranych z dwu niezależnych populacji są jednakowo duże (102).

Do wyznaczenia optymalnej wartości *cut-off* w interpretacji wyniku testu QFT oraz w celu sprawdzenia możliwości diagnostycznego wykorzystania różnych parametrów mierzonych w teście QFT posłużono się analizą krzywych ROC. Krzywe ROC (Receiver Operating Characteristic) są narzędziem służącym do oceny poprawności klasyfikatora (pojedynczej zmiennej lub całego modelu), zapewniają one łączny opis jego czułości i specyficzności (103).

Do obliczeń statystycznych wykorzystano program Analyse-It.

4. Wyniki

4.1. Charakterystyka grupy badanej

W tabeli 4 przedstawiono charakterystykę demograficzną grup pacjentów wydzielonych zgodnie z rozpoznaniem klinicznym (według nomenklatury Międzynarodowej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych ICD-10) na podstawie epikryzy.

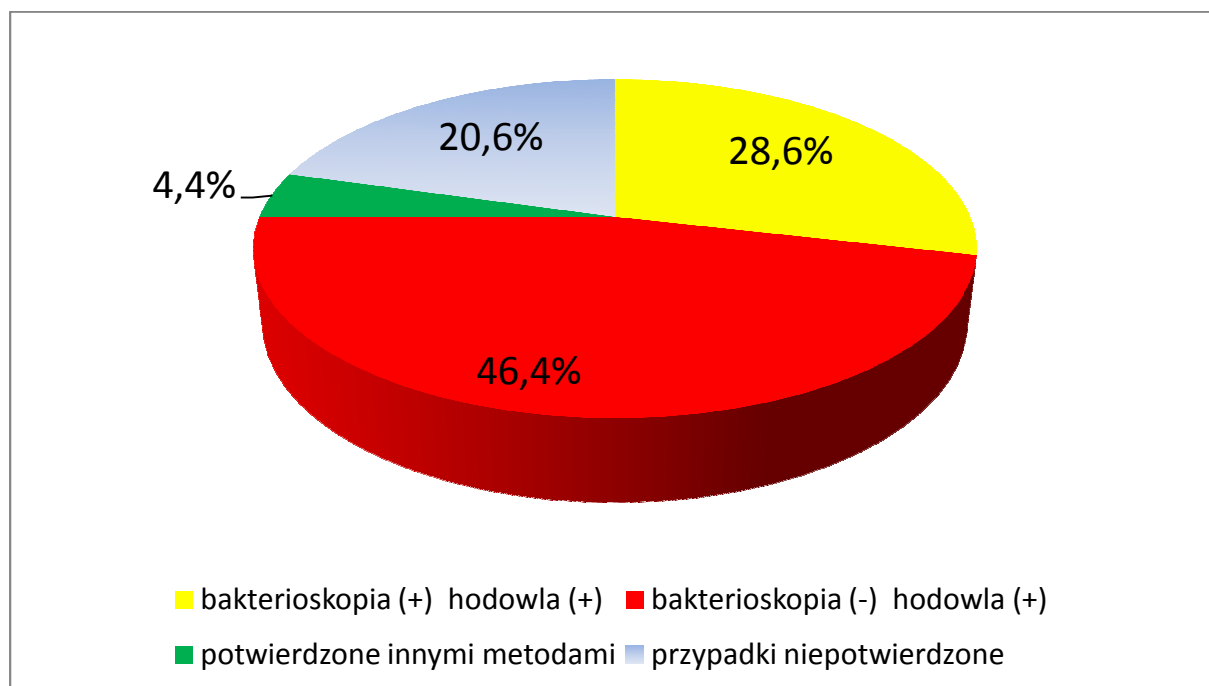
| Rozpoznanie | n (%) | płeć (M/K) | wiek (min. – max.) | mediana | średni wiek (w latach) |
|---|-------------|---------------------------|--------------------|---------|------------------------|
| Gruźlica układu oddechowego, bakteriologicznie i histologicznie potwierdzona (A-15) | 200 (20,4%) | 130 / 70 65,0% / 35,0% | 18 - 88 | 49,0 | 50,2 ± 17,5 |
| Gruźlica układu oddechowego, nie potwierdzona bakteriologicznie i histologicznie (A-16) | 52 (5,3%) | 34 / 18 65,4% / 34,6% | 23 - 82 | 59,2 | 57,3 ± 13,6 |
| rozpoznanie inne niż gruźlica | 727 (74,3%) | 434/293 59,7% / 40,3% | 18 - 91 | 58,0 | 56,9 ± 16,0 |

Tab. 4. Podział grupy badanej wg rozpoznania.

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic wiekowych pomiędzy poszczególnymi grupami ($p > 0,05$).

4.2. Wyniki badań mikrobiologicznych w badanej populacji

W trakcie prowadzonej diagnostyki klinicznej gruźlicę płuc rozpoznano u 252 pacjentów, co stanowiło 25,7% badanej populacji. Badaniami mikrobiologicznymi *sensu stricto*, genetycznymi i histopatologicznymi gruźlicę potwierdzono u 200 pacjentów (20,4%). U pozostałych 52 pacjentów (5,3%) rozpoznanie postawiono na podstawie obrazu radiologicznego płuc i objawów klinicznych. Wyniki wszystkich badań laboratoryjnych wykonanych w celu wykrycia *M. tuberculosis* u pacjentów z rozpoznaniem A-16 oraz w grupach rozpoznań innych niż gruźlica były ujemne. Oznacza to, że odsetek przypadków definitywnych (potwierdzonych) wśród ogółu przypadków gruźlicy wyniósł 79,4%. W przypadku 727 pacjentów (74,3% badanej populacji) wyniki badań klinicznych, obrazowych i laboratoryjnych wykluczyły rozpoznanie gruźlicy. Strukturę bakteriologiczną 252 przypadków gruźlicy wykrytych w trakcie badania przedstawia rys. 5.



Rys. 5. Struktura bakteriologiczna przypadków gruźlicy płuc stwierdzonych w badaniu.

4.3. Wyniki badań mikrobiologicznych w grupie pacjentów z definitywnym rozpoznaniem gruźlicy

Strukturę potwierdzeń przypadków gruźlicy zweryfikowanych dodatnimi wynikami badań laboratoryjnych: bakterioskopii preparatów barwionych metodą Ziehl-Nelsena lub auraminową, hodowli na podłożach Loewenstein-Jensen lub na podłożach płynnych w systemie automatycznym MB/BacT, badania genetycznego testem MTD-2 w systemie Gen-Probe oraz badania histologicznego na obecność ziarniny gruźliczej przedstawia tabela 5.

| Wynik badania | liczba przypadków | Odsetek |
|---|-------------------|---------|
| bakterioskopia – dodatni oraz hodowla – dodatni | 72 | 36,0% |
| bakterioskopia – ujemny oraz hodowla – dodatni | 117 | 58,5% |
| bakterioskopia – ujemny oraz hodowla – ujemny, badanie genetyczne – dodatni | 6 | 3,0% |
| bakterioskopia – ujemny oraz hodowla – ujemny, badanie histologiczne – dodatni | 5 | 2,5% |
| Razem | 200 | 100% |

Tab. 5. Struktura potwierdzeń przypadków gruźlicy zweryfikowanych dodatnimi wynikami badań laboratoryjnych.

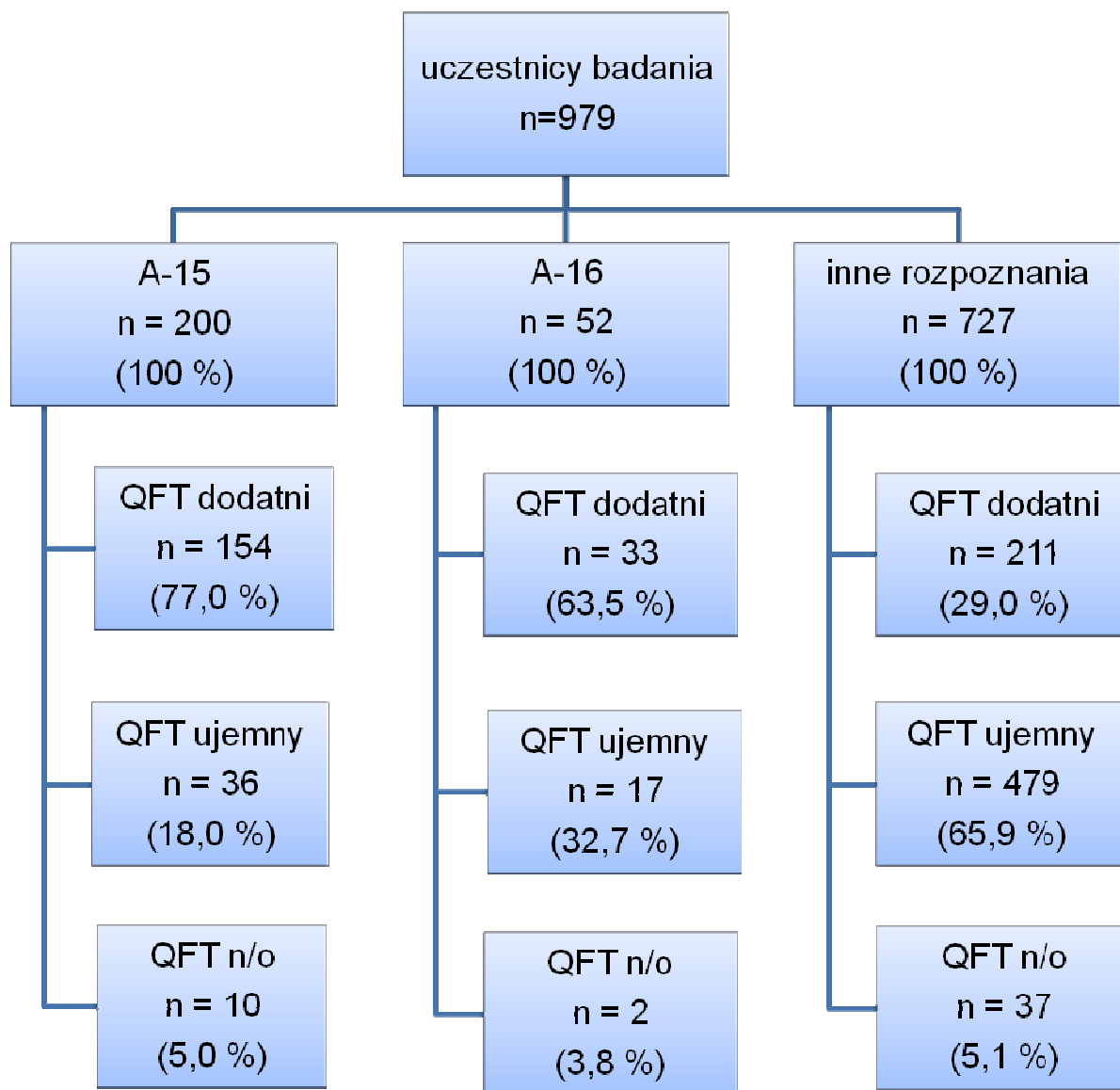
4.4. Wyniki testu QuantiFERON-TB Gold in tube

Wyniki testu i procentowy udział różnych kategorii wyniku w całości grupy badanej przedstawia tabela 6. Kategorię wyniku (dodatni, ujemny, „nieokreślony”) ustalono stosując kryteria określone przez producenta testu.

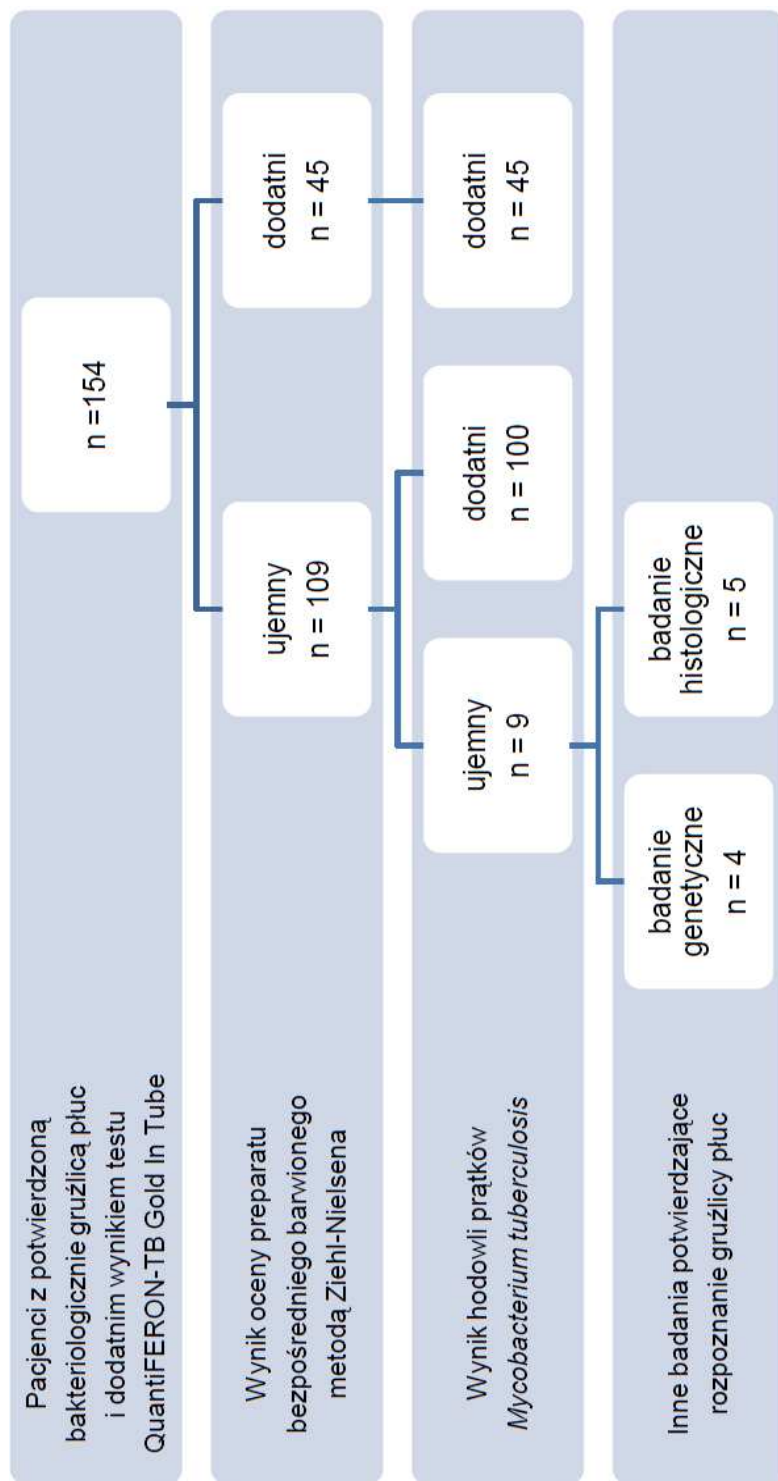
| Wynik testu QuantiFERON-TB Gold in tube | Rozpoznanie | | | Razem |
|---|--|---|---|-------|
| | Gruźlica układu oddechowego, bakteriologicznie i histologicznie potwierdzona (A-15) (n = 200) | Gruźlica układu oddechowego, nie potwierdzona bakteriologicznie i histologicznie (A-16) (n = 52) | rozpoznania inne niż gruźlica (n = 727) | |
| dodatni | 154 (77,0 %) | 33 (63,5 %) | 211 (29,0 %) | 398 |
| ujemny | 36 (18,0 %) | 17 (32,7 %) | 479 (65,9 %) | 532 |
| nieokreślony | 10 (5,0 %) | 2 (3,8 %) | 37 (5,1 %) | 49 |
| razem | 200 | 52 | 727 | 979 |

Tab. 6. Wyniki testu QuantiFERON-TB Gold in tube w badanej grupie.

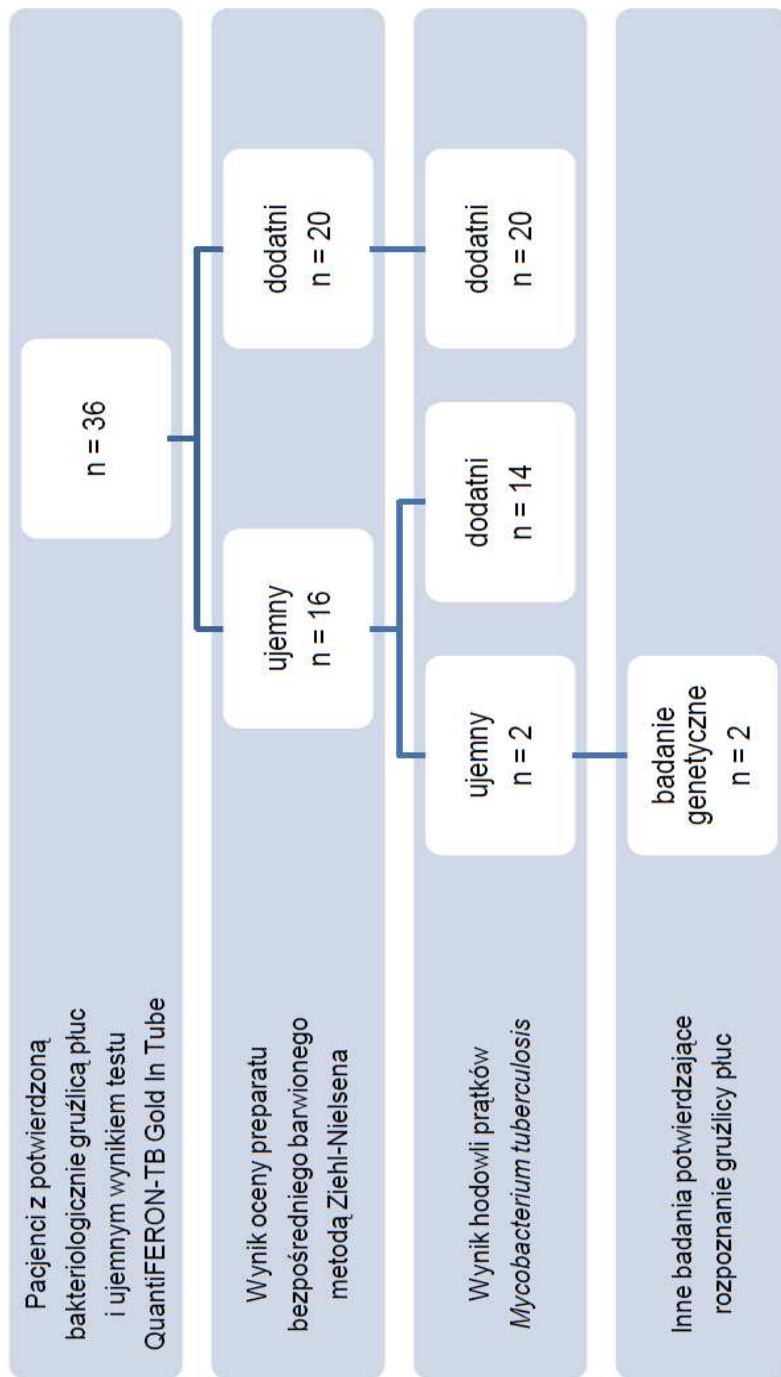
Wyniki badań uzyskane jako potwierdzenie rozpoznania u pacjentów z definitywną postacią gruźlicy płuc w grupach w zależności od wyniku testu QFT przedstawiają rysunki 6, 7, 8 i 9.



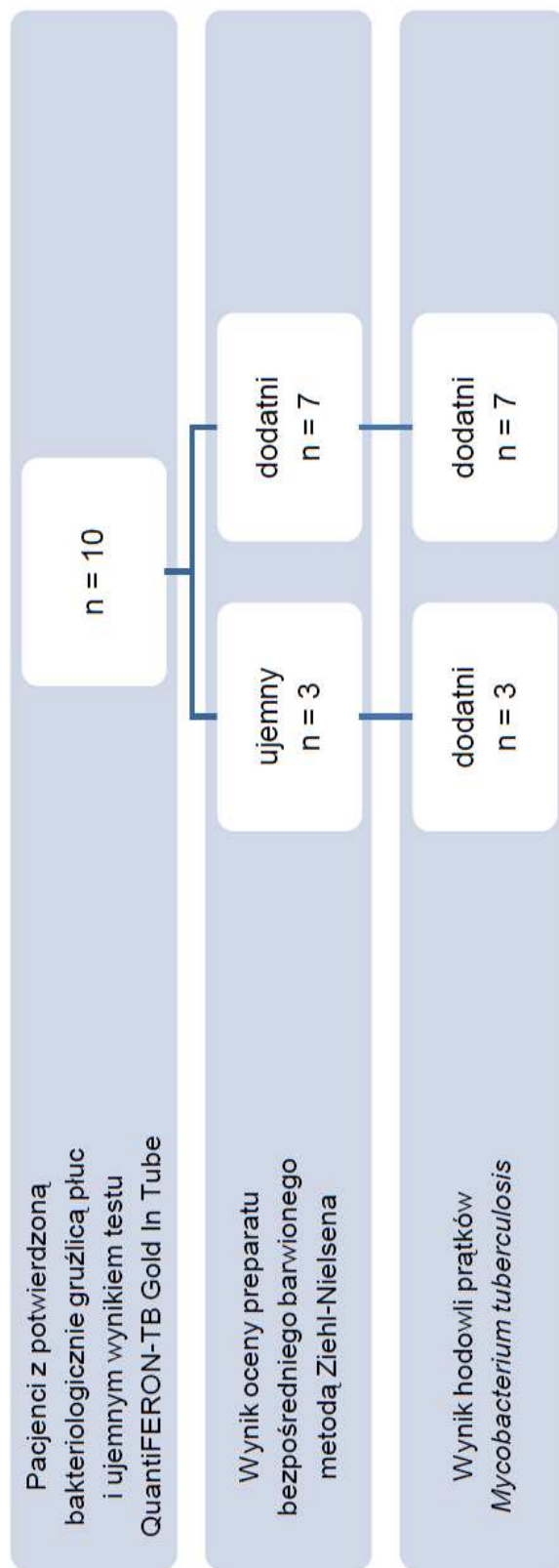
Rys 6. Wynik testu QFT w grupach pacjentów w zależności od rozpoznania.



Rys. 7. Wyniki badań laboratoryjnych w grupie pacjentów z definitywną postacią gruźlicy płuc oraz dodatnim wynikiem testu QuantiFERON-TB Gold In Tube.



Rys. 8. Wyniki badań laboratoryjnych w grupie pacjentów z definitywną postacią gruźlicy płuc oraz ujemnym wynikiem testu QuantiFERON-TB Gold In Tube.



Rys. 9. Wyniki badań laboratoryjnych w grupie pacjentów z definitywną postacią gruźlicy płuc oraz „nieokreślonym” wynikiem testu QuantiFERON-TB Gold In Tube.

4.5. Analiza statystyczna wyników testu QFT

4.5.1. Analiza statystyczna w ujęciu jakościowym

Dla dokonania analizy jakościowej brano pod uwagę tylko kategorię uzyskanych wyników testu QFT: wyniki dodatnie, ujemne i nieokreślone. Uzyskane wyniki testu podzielono na grupy wyników prawdziwie dodatnich (TP), prawdziwie ujemnych (TN), fałszywie dodatnich (FP) i fałszywie ujemnych (FN) zgodnie z algorytmem opisanym w rozdziale 3.3. W zależności od założenia wykorzystania testu/testów QFT/QFT+AFB jako potwierdzającego/potwierdzających bądź wykluczającego/wykluczających uzyskano grupy o liczebności przedstawionej w tabeli 7.

| | TP | FN | TN | FP |
|-----------|---------------------|----|-----|-----|
| | TEST POTWIERDZAJĄCY | | | |
| QFT | 154 | 46 | 516 | 211 |
| QFT + AFB | 181 | 19 | 516 | 211 |
| | TEST WYKLUCZAJĄCY | | | |
| QFT | 164 | 36 | 479 | 248 |
| QFT + AFB | 184 | 16 | 479 | 248 |

Tab. 7. Liczebność grup w badaniu dla różnych wariantów analizy wyników przy zastosowaniu wartości *cut-off* wyznaczonej przez producenta testu (**0,35 I.U./ml**).

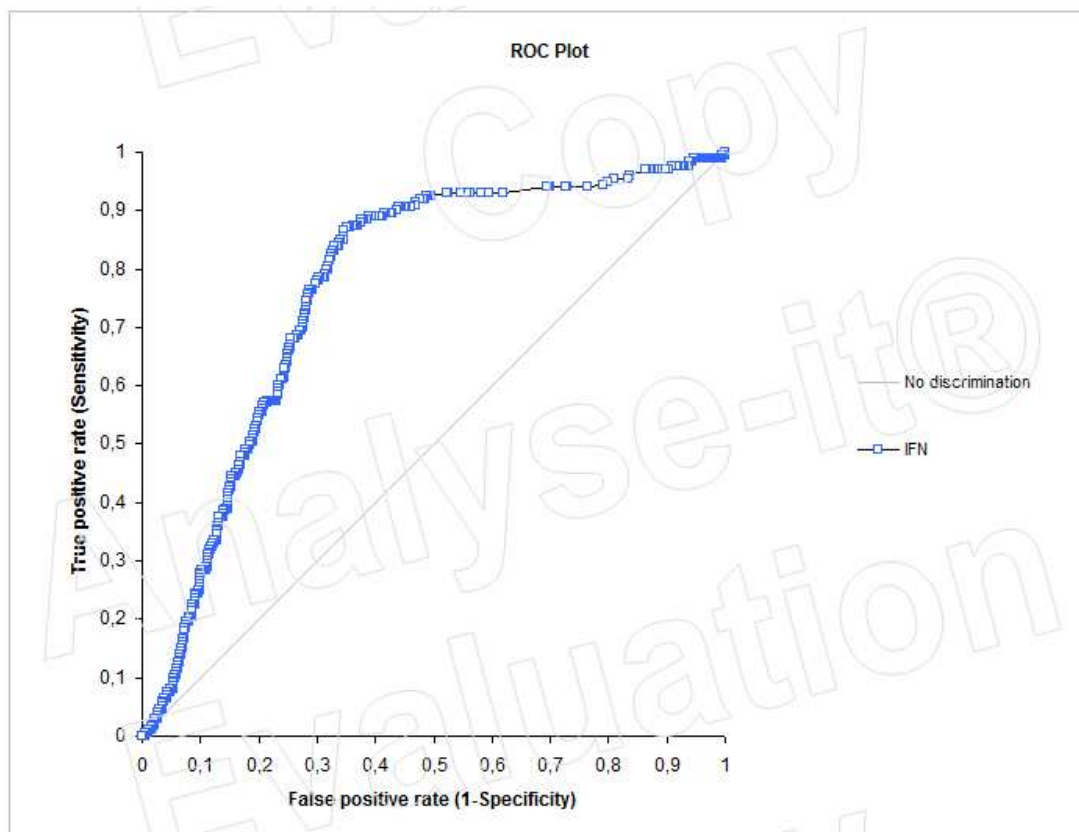
Dla dobranych w ten sposób grup obliczono czułość, specyficzność, dodatnią oraz ujemną wartość predykcyjną testu (tabela 8).

| | czułość (95% CI) | specyficzność (95% CI) | PPV (95% CI) | NPV (95% CI) |
|-----------|------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|
| | TEST POTWIERDZAJĄCY | | | |
| QFT | 77,0% (70,5 – 82,6) | 71,0% (67,5 – 74,3) | 42,2% (37,1 – 47,4) | 91,8% (89,2 – 94,0) |
| QFT + AFB | 90,5% (85,6 – 94,2) | 71,0% (67,5 – 74,3) | 46,2% (41,2 – 51,3) | 96,5% (94,5 – 97,9) |
| | TEST WYKLUCZAJĄCY | | | |
| QFT | 82,0% (76,0 – 87,1) | 65,9% (62,3 – 69,3) | 39,8% (35,1 – 44,7) | 93,0% (90,5 – 95,1) |
| QFT + AFB | 92,0% (87,3 – 95,4) | 65,9% (62,3 – 69,3) | 42,6% (37,9 – 47,4) | 96,8% (94,5 – 98,1) |

Tab. 8. Parametry statystyczne testu/testów QFT/QFT+AFB dla wartości *cut-off* wyznaczonej przez producenta testu (**0,35 I.U./ml**).

4.5.2. Analiza statystyczna w ujęciu ilościowym

Dla przeprowadzenia analizy statystycznej w ujęciu ilościowym brano pod uwagę ilościowy wynik testu wyrażony stężeniem wydzielanego interferonu-gamma. W tym celu przeprowadzono analizę metodą krzywej ROC. Krzywą ROC wyznaczono, zgodnie z przyjętym założeniem, dla wszystkich wyników testu QFT otrzymanych dla grupy z definitywnie potwierdzoną gruźlicą (A-15) oraz dla grupy z rozpoznaniem innymi niż gruźlica. Tak wyznaczoną krzywą przedstawia rysunek 10. Obliczone pole powierzchni pod krzywą ROC wynosi 0,77 (95% CI: 0,73 – 0,80).



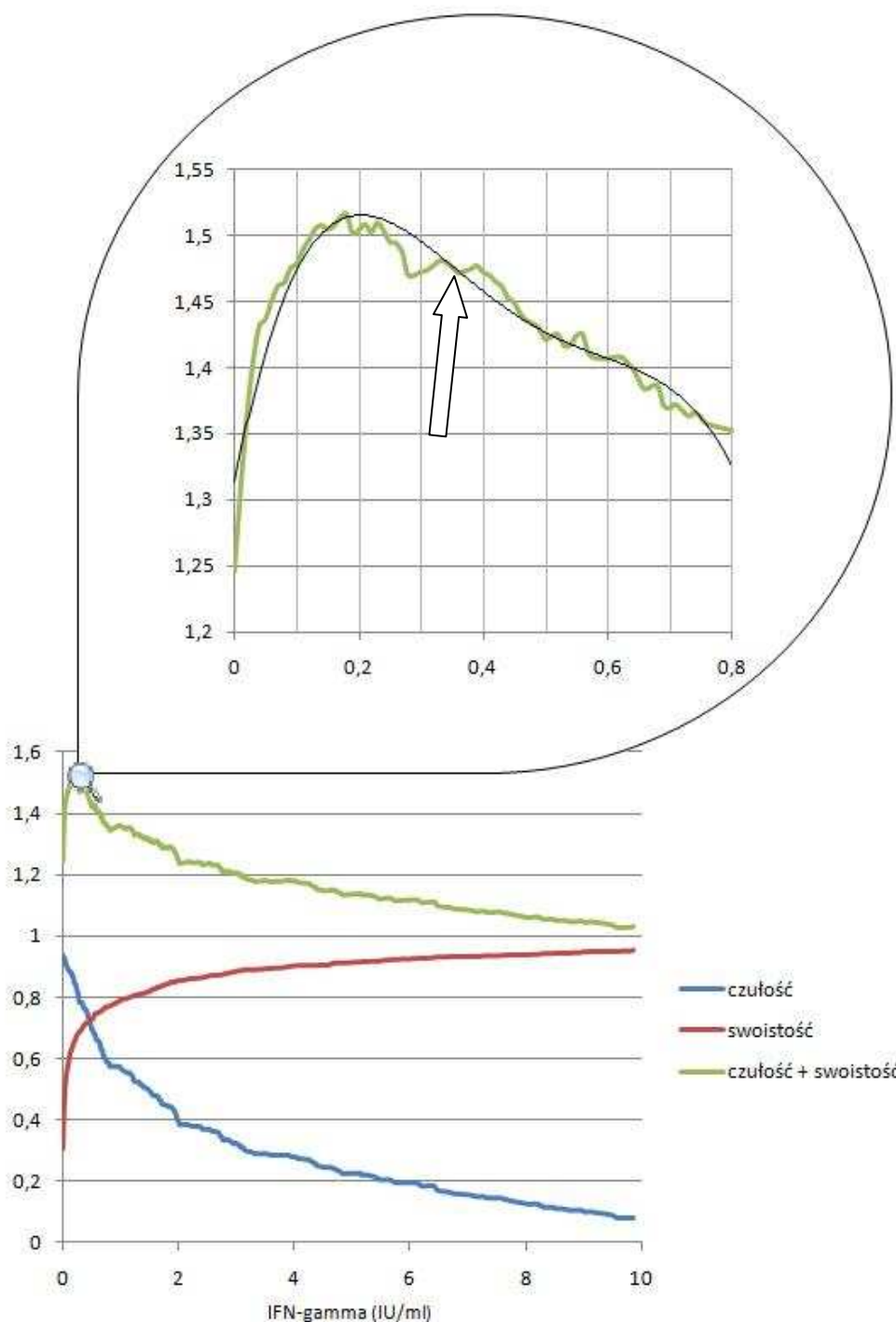
Rys. 10. Krzywa ROC dla wyników testu QFT w grupach pacjentów z potwierdzoną laboratoryjnie gruźlicą płuc oraz z rozpoznaniem innymi niż gruźlica.

4.6. Próba wyznaczenia optymalnej wartości *cut-off* testu QFT

Wykorzystując dane otrzymane z analizy krzywej ROC ustalono czułość i specyficznosc testu w całym zakresie otrzymanych wyników, a następnie dane te wykorzystano do ustalenia optymalnej wartości *cut-off* testu. Jako punkt optymalnej wartości *cut-off* przyjęto punkt, w którym suma parametrów czułości i specyficznosci uzyskuje maksymalną wartość (rys. 11). Zgodnie z tak przyjętym założeniem optymalne parametry statystyczne test przyjmuje dla wartości *cut-off* równej 0,20 I.U./ml.

Dla wyznaczonej w ten sposób wartości *cut-off* dokonano przeliczenia liczebności wyników dodatnich i ujemnych, a następnie obliczono parametry

statystyczne analogicznie do obliczeń dokonanych dla wartości ustalonej przez producenta testu (tabele 9 i 10).



Rys. 11. Graficzna interpretacja metody wyznaczenia optymalnej wartości *cut-off* testu QFT (strzałką oznaczona wartość *cut-off* określona przez producenta testu)

| | TP | FN | TN | FP |
|-----------|---------------------|----|-----|-----|
| | TEST POTWIERDZAJĄCY | | | |
| QFT | 169 | 31 | 483 | 244 |
| QFT + AFB | 185 | 15 | 483 | 244 |
| | TEST WYKLUCZAJĄCY | | | |
| QFT | 179 | 21 | 447 | 280 |
| QFT + AFB | 188 | 12 | 447 | 280 |

Tab. 9. Liczebność grup w badaniu dla różnych wariantów analizy wyników przy zastosowaniu wyznaczonej empirycznie optymalnej wartości *cut-off* (0,20 I.U./ml).

| | czułość (95% CI) | specyficzność (95% CI) | PPV (95% CI) | NPV (95% CI) |
|-----------|------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|
| | TEST POTWIERDZAJĄCY | | | |
| QFT | 84,5% (78,7 – 89,2) | 66,4% (62,9 – 69,9) | 40,9% (36,1 – 45,8) | 94,0% (91,6 – 95,9) |
| QFT + AFB | 92,5% (87,9 – 95,7) | 66,4% (62,9 – 69,9) | 43,1% (38,4 – 48,0) | 97,0% (95,1 – 98,3) |
| | TEST WYKLUCZAJĄCY | | | |
| QFT | 89,5% (84,4 – 93,4) | 61,5% (62,3 – 69,3) | 39,0% (34,5 – 43,6) | 95,5% (93,2 – 97,2) |
| QFT + AFB | 94,0% (89,8 – 96,9) | 61,5% (62,3 – 69,3) | 40,2% (35,7 – 44,8) | 97,4% (95,5 – 98,6) |

Tab. 10. Parametry statystyczne testu/testów QFT/QFT+AFB dla wyznaczonej empirycznie optymalnej wartości *cut-off* (0,20 I.U./ml).

4.7. Czy można wykorzystać parametry składowe testu QFT do różnicowania grupy pacjentów z rozpoznaną gruźlicą od pacjentów z innymi rozpoznaniemami?

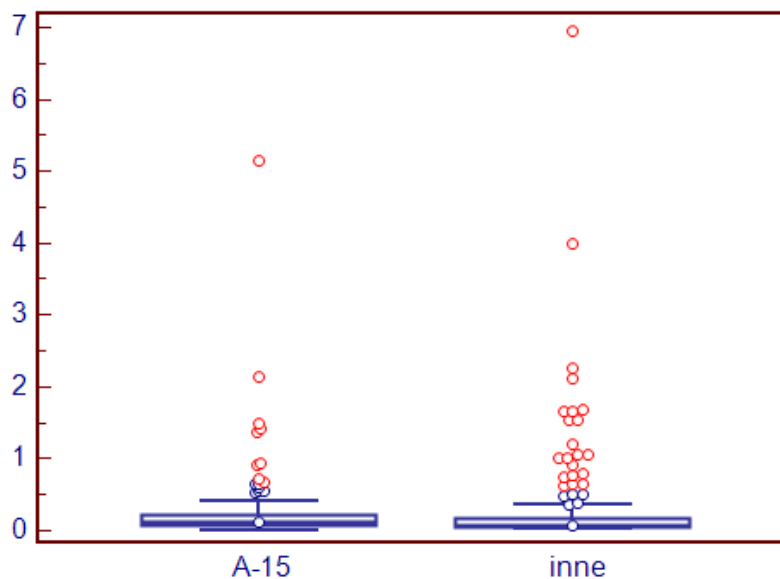
Wykorzystując test U Manna-Whitneya dokonano porównania parametrów służących do interpretacji wyniku testu QFT:

- stężenia endogennego interferonu-gamma w próbce (NIL)
- stężenia interferonu uwalnianego po stymulacji mitogenem (MITOGEN)

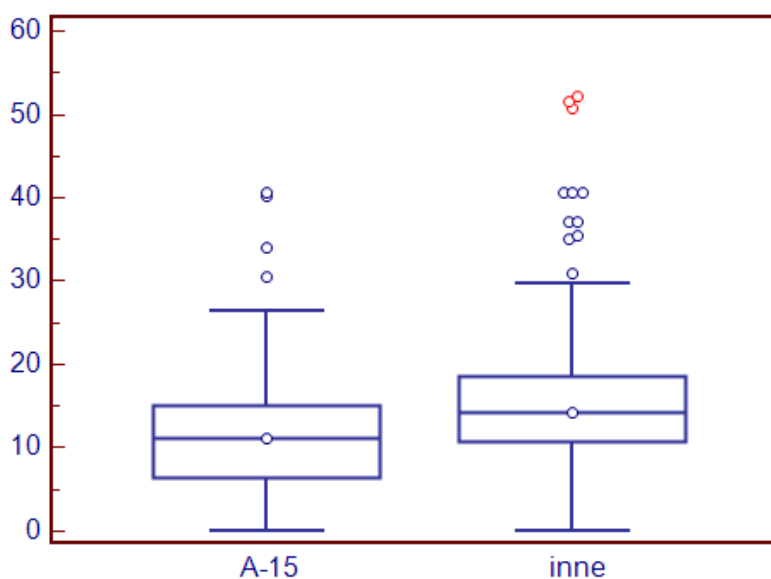
Porównano wyniki uzyskane w grupie pacjentów z potwierdzoną bakteriologicznie gruźlicą z wynikami dla grupy pacjentów z chorobami płuc innymi niż gruźlica. Parametry porównywano oddzielnie dla grupy wyników dodatnich i ujemnych testu QFT. Charakterystykę tak dobranych grup oraz porównawczą analizę statystyczną przedstawia tabela 11, a graficzną interpretację dla grup wyników różniących się w sposób statystycznie istotny – rysunki 12 – 14.

| analizowany parametr | liczebność grupy wg rozpoznania | | różnica mediany dla grup (95% CI) | p |
|-------------------------|---------------------------------|------|-----------------------------------|-------------------|
| | A-15 | inne | | |
| wynik testu QFT dodatni | | | | |
| NIL | 154 | 211 | 0,02 (0,01 – 0,04) | 0,004 |
| MITOGEN | | | -3,38 (-4,84 - -1,97) | <0,0001 |
| wynik testu QFT ujemny | | | | |
| NIL | 36 | 479 | 0,03 (0,01 – 0,05) | 0,0084 |
| MITOGEN | | | -0,86 (-3,53 – 1,32) | 0,4386 |

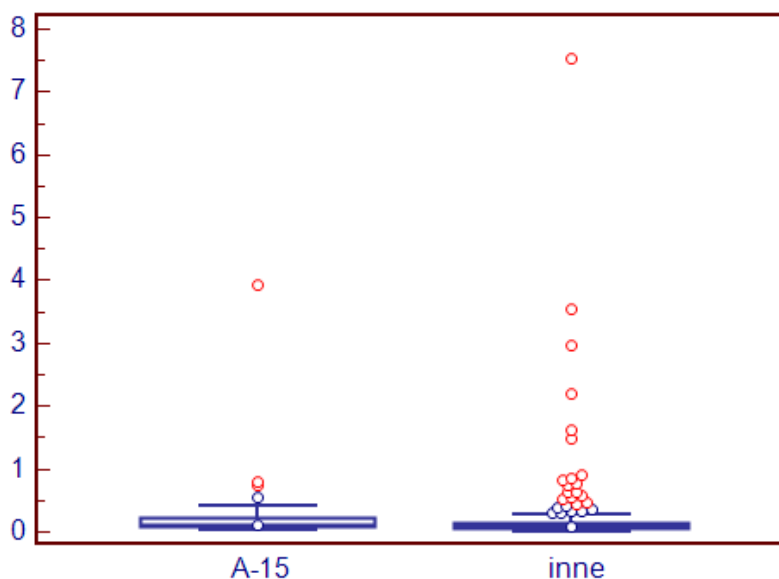
Tab. 11. Porównanie rozkładu wartości wyników składowych parametrów testu QFT dla grup pacjentów z gruźlicą płuc oraz innymi niż gruźlica rozpoznaniemami.



Rys. 12. Rozkład wartości wyniku NIL (wyrażone w I.U. interferonu-gamma/ml) u pacjentów z dodatnim wynikiem testu QFT. Porównanie grup pacjentów z potwierdzoną gruźlicą płuc (A-15) oraz z innymi niż gruźlica rozpoznaniem.



Rys. 13. Rozkład wartości wyniku MITOGEN (wyrażone w I.U. interferonu-gamma/ml) u pacjentów z dodatnim wynikiem testu QFT. Porównanie grup pacjentów z potwierdzoną gruźlicą płuc (A-15) oraz z innymi niż gruźlica rozpoznaniem.



Rys. 14. Rozkład wartości wyniku NIL (wyrażone w I.U. interferonu-gamma/ml) u pacjentów z ujemnym wynikiem testu QFT. Porównanie grup pacjentów z potwierdzoną gruźlicą płuc (A-15) oraz z innymi niż gruźlica rozpoznaniem.

Analiza statystyczna potwierdziła istotne statystycznie różnice parametrów NIL i MITOGEN dodatnich wyników testu QFT pomiędzy grupą pacjentów chorych na gruźlicę oraz grupą chorych na inne choroby płuc, oraz parametru NIL w grupie ujemnych wyników testu QFT. W przypadku parametru MITOGEN ujemnych wyników testu QFT nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy pacjentami z gruźlicą i z chorobami innymi niż gruźlica.

Wartości stężenia endogenego interferonu-gamma (NIL) były wyższe w grupie pacjentów z gruźlicą, niż u pacjentów z innymi chorobami płuc niezależnie od uzyskanej kategorii wyniku testu QFT (dodatni lub ujemny). Stężenia interferonu-gamma uwolnionego po stymulacji mitogenem (MITOGEN) były wyższe w grupie pacjentów z dodatnim wynikiem testu QFT, u których czynnej gruźlicy nie stwierdzono.

Sprawdzono możliwość diagnostycznego wykorzystania pomiaru tych parametrów jako testu różnicującego rozpoznanie choroby. W tym celu przeprowadzono analizę krzywych ROC, a wartość dyskryminacyjną testu określono na podstawie oceny pola powierzchni pod krzywą ROC. Otrzymane wyniki (tabela 12) nie dają podstawy do wykorzystania pomiaru parametrów NIL i MITOGEN do różnicowania rozpoznania gruźlicy od innych chorób płuc w obrębie grup wyników dodatnich i ujemnych testu QFT.

| badany parametr | wynik testu QFT | liczebność grupy wg rozpoznania | | pole powierzchni pod krzywą ROC | 95% CI |
|-----------------|-----------------|---------------------------------|------|---------------------------------|-------------|
| | | A-15 | inne | | |
| NIL | dodatni | 154 | 211 | 0,59 | 0,53 – 0,72 |
| MITOGEN | | | | 0,65 | 0,59 – 0,70 |
| NIL | ujemny | 36 | 479 | 0,63 | 0,54 – 0,72 |

Tab. 12. Wartości pola powierzchni pod krzywą ROC dla wybranych wariantów analizy wartości dyskryminacyjnej parametrów składowych testu QFT.

5. Dyskusja

Diagnostyka gruźlicy jest jednym z trudniejszych zadań stojących przed klinicystą i diagnostą laboratoryjnym. Specyficzny charakter drobnoustroju wywołującego tę chorobę – *Mycobacterium tuberculosis complex* – sprawia, że jego diagnostyka rodzi wiele problemów praktycznych. Mówiąc o specyficznych cechach prątka gruźlicy utrudniających diagnostykę należy wymienić:

- a) wysokie wymagania odżywcze (104)
- b) bardzo długi czas podziałów komórkowych (105)
- c) indukowanie odpowiedzi humoralnej na niskim poziomie (40, 41).

Wymienione w punktach a) i b) trudności udało się w ostatnich dekadach XX wieku ominąć wprowadzając do diagnostyki automatyczne systemy hodowlane, w których zastosowano płynne podłoża hodowlane oraz systemy detekcji o czułości wyższej od oferowanej przez wcześniej stosowane metody konwencjonalne (hodowle na podłożach jajowych Loewenstein-Jensen) (25). Szerokie stosowanie metod automatycznych w niniejszym badaniu może tłumaczyć wysoki odsetek potwierdzeń gruźlicy badaniami mikrobiologicznymi wynoszący 75%, podczas gdy średnia dla całego kraju wynosi 63,4% (12). Podstawową zaletą systemów automatycznych jest skrócenie czasu niezbędnego do potwierdzenia wzrostu prątków gruźlicy.

Nawet stosowanie takich systemów wymaga jednak czasu liczonego często w tygodniach dla uzyskania dodatniego wyniku hodowli. Oczekiwanie na wynik hodowli bardzo opóźnia definitywne potwierdzenie gruźlicy w przypadku materiałów z ujemnym wynikiem bakterioskopii. Oparcie zaś rozpoznania tylko na objawach klinicznych może prowadzić do błędnego postawienia diagnozy. Przykładem takiej sytuacji mogą być przypadki pacjentów, u których szybkim badaniem cytologicznym lub histopatologicznym potwierdzano chorobę

nowotworową, później zaś otrzymywano wynik hodowli potwierdzający współistniejącą gruźlicę płuc (106). Sytuacja taka w sposób radykalny zmieniała sposób prowadzenia procesu terapeutycznego.

W kontekście czasu uzyskania wyniku dodatniego przewagę nad metodami hodowlanymi cały czas posiada metoda bakterioskopii, która pozwala stwierdzić obecność form kwasoopornych już w dniu otrzymania materiału klinicznego do badania. Metoda ta, istniejąca w niemal niezmienionej postaci od czasów Roberta Kocha, pomimo swych wad ciągle jest stosowana przez laboratoria prątki na całym świecie. Jedną z tych wad jest brak bezwzględnej specyficzności wobec *Mycobacterium tuberculosis*, gdyż prątki gruźlicy oraz prątki niegruźlicze są praktycznie nieodróżnialne w obrazie mikroskopowym (16). W grupie badanej nie stwierdzono ani jednego takiego przypadku, tzn. zaobserwowania form kwasoopornych w preparacie bezpośrednim, które okazałyby się w trakcie hodowli bakteriami innymi niż prątki gruźlicy. Drugą wadą tej metody to stosunkowo niska czułość. Ocenia się bowiem, że dodatni wynik preparatu bezpośredniego można stwierdzić dopiero wówczas, gdy liczba prątków wynosi nie mniej niż 5000 komórek w mililitrze badanego materiału (16). Według danych Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w roku 2009 dodatni wynik preparatu bezpośredniego uzyskano tylko w 37,2% wszystkich przypadków gruźlicy w Polsce (potwierdzonej i niepotwierdzonej w badaniach laboratoryjnych), zaś w grupie chorych z gruźlicą potwierdzoną dodatni wynik bakterioskopii uzyskano w 58,7% przypadków (12). Oznacza to, że u 41,3% tych chorych definitywne potwierdzenie uzyskano z opóźnieniem wynikającym z konieczności oczekiwania na wynik hodowli. Jak wynika z cytowanego opracowania odsetek ten różni się pomiędzy województwami dosyć znacznie a różnice te wynikają z poziomu wyposażenia laboratoriów w nowoczesne systemy

diagnostyczne, organizacji sieci laboratoriów, współpracy lekarzy z laboratoriami. W grupie poddanej obserwacji w niniejszym badaniu potwierdzenie gruźlicy dodatnim wynikiem bakterioskopii uzyskano w 28,6% (średnia dla Polski 37,2%) wszystkich przypadków gruźlicy płuc, zaś w grupie 200 chorych z definitywnym, tzn. potwierdzonym badaniami mikrobiologicznymi, rozpoznaniem gruźlicy dodatni wynik bakterioskopii uzyskano jedynie w 36% przypadków (średnia dla Polski 58,7%). Taką strukturę potwierdzeń może tłumaczyć wysoka czułość stosowanych w laboratorium badań hodowlanych, które pozwalają uzyskać dodatni wynik hodowli z materiałów uzyskanych od pacjentów skąpo prątkujących. Oznacza to również, że w 64% przypadków uzyskano opóźnione potwierdzenie gruźlicy.

Zastosowanie badań genetycznych i histologicznych, z założenia szybkich, czułych i specyficznych ciągle jeszcze jest ograniczone. W przypadku badań genetycznych czynnik ograniczający ma charakter pozamerytoryczny – są to badania stosunkowo drogie i z tego powodu rzadko zlecane przez lekarzy. Badanie histologiczne jest zaś ograniczone do wąskiej grupy pacjentów, u których stwierdzono wskazania do wykonania zabiegu chirurgicznego, w trakcie którego pobierano tkankę do badań laboratoryjnych.

Jeśli chodzi o typową diagnostykę serologiczną, tzn. wykrywanie przeciwciał skierowanych przeciw antygenom prątka, to metody te zasadniczo nie weszły do panelu metod rutynowo stosowanych w rozpoznawaniu gruźlicy. Dzieje się tak ze względu na marginalny udział odpowiedzi humoralnej jako reakcji na zakażenie prątkiem (40, 41).

Oprócz wyżej wymienionych metod laboratoryjnej diagnostyki gruźlicy pomocnicze znaczenie w rozpoznawaniu tej choroby ma badanie skórny odczynu tuberkulinowego. Metoda ta, zaproponowana niemal jednocześnie na przełomie

XIX i XX wieku w różnych postaciach przez kilku badaczy, utrzymywała swoją pozycję, jako testu pomocniczego w diagnostyce, przez prawie cały XX wiek. Liczne badania wykonane współcześnie wykazują jednak ograniczoną specyficzność wyników otrzymanych przy zastosowaniu tych metod, zwłaszcza w krajach, w których stosowano schemat wielokrotnego szczepienia szczepionką BCG (50 - 53).

Ograniczenia dotyczące wszelkich do tej pory stosowanych metod, zwłaszcza te, które dotyczą niskiej czułości badań laboratoryjnych (jak w przypadku bakterioskopii) i długiego czasu oczekiwania na wynik (jak w przypadku metod hodowlanych) nakazują ciągle poszukiwać nowych rozwiązań diagnostycznych.

Duże nadzieje wiązano z innowacyjnymi testami – testami uwalniania interferonu-gamma (IGRA), które weszły do rutynowej diagnostyki pod koniec XX wieku. Pozbawione wad skórnych odczynów tuberkulinowych stały się ważnym narzędziem diagnostycznym, służącym identyfikacji osób zakażonych prątkiem gruźlicy. Takie umiejscowienie tych testów w schematach diagnostycznych znalazło potwierdzenie w wytycznych towarzystw naukowych i organizacji nadzoru epidemiologicznego jako testu umożliwiającego wykrycie zakażenia prątkiem gruźlicy (59-62).

Od momentu wprowadzenia testów IGRA próbowano także ustalić ich znaczenie w diagnostyce aktywnych postaci gruźlicy. W licznych badaniach próbuje się ustalić, czy ilościowe wyniki testu pozwalają rozróżnić latentne zakażenie prątkiem od aktywnej postaci gruźlicy (82-94).

W niniejszym badaniu podjęto próbę określenia znaczenia tych testów w grupie pacjentów dorosłych, u których obraz kliniczny choroby wymagał wdrożenia diagnostyki różnicowej z uwzględnieniem gruźlicy płuc. W tym celu, oprócz badań rutynowo zlecanych w takich przypadkach, dodatkowo wykonywano test

QuantiFERON-TB Gold In Tube. Krew do testu QFT pobierano pacjentom równocześnie z pobraniem materiałów do badań mikrobiologicznych, zawsze przed ewentualnie włączoną terapią przeciwprątkową. Wykonywany do tej pory, jako test pomocniczy, tuberkulinowy odczyn skórny nie wnosił do tej diagnostyki istotnych informacji, co wykazano w innym badaniu przeprowadzonym na podobnej grupie chorych (54). Diagnostykę każdego z 979 włączonych do niniejszego opracowania pacjentów, na potrzeby tego opracowania, uważano za zakończoną w momencie definitywnego zakończenia diagnostyki mikrobiologicznej, tzn. wyhodowania prątków i ich identyfikacji do poziomu gatunku, ewentualnie wykonania badania genetycznego lub histologicznego, bądź uzyskania ujemnych wyników wszystkich wymienionych badań. Uzyskane wyniki konfrontowano z rozpoznaniem klinicznym. Na tej podstawie stwierdzono, że w badanej grupie znalazło się 200 osób z rozpoznaną i potwierdzoną badaniami gruźlicą płuc oraz 727 osób, u których wyniki badań mikrobiologicznych oraz ewentualnie genetycznych i histologicznych były ujemne i pokrywały się z rozpoznaniem klinicznym, które było inne niż gruźlica. W 52 przypadkach stwierdzono rozbieżność pomiędzy wynikami tych badań a rozpoznaniem klinicznym, gdyż pomimo ujemnych wyników badań na podstawie symptomów klinicznych i/lub obrazu radiologicznego i/lub odpowiedzi na włączone leczenie przeciwprątkowe postawiono rozpoznanie gruźlicy. Tę grupę pacjentów wyłączono z dalszej analizy, gdyż w myśl definicji Światowej Organizacji Zdrowia nie można w jej przypadku rozpoznania gruźlicy traktować w sposób definitywny.

Dodatni wynik testu QFT uzyskano u 77% pacjentów z rozpoznaną gruźlicą i u 29% pacjentów z innymi rozpoznaniem, natomiast ujemne wyniki testu odpowiednio u 18% i 65,9% pacjentów. Wynik należący do kategorii „nieokreślony” w obydwóch grupach wystąpił u 5% pacjentów. Z powyższych danych widać,

że czułość testu jest daleka od absolutnej. W zależności od tego, czy test wykorzystamy jako potwierdzający chorobę (to znaczy, że tylko wyniki dodatnie testu QFT uznamy za potwierdzające chorobę, zaś wyniki „nieokreślone” włączymy do grupy wyników ujemnych), czy też jako wykluczający (wówczas tylko wyniki ujemne uznamy za wykluczające chorobę, „nieokreślone” włączymy do grupy wyników dodatnich) uzyskamy czułość testu odpowiednio 77% bądź 82%. Czułość testu jest zdecydowanie lepsza w przypadku stosowania go jako testu wykluczającego gruźlicę. Wartość tego parametru testu obniżają przypadki pacjentów z potwierdzoną gruźlicą i ujemnym wynikiem testu QFT. Przyczyną takiej sytuacji może być fakt, że test wykonywany jest przy użyciu krwi obwodowej. Limfocyty krążące we krwi obwodowej stanowią zaś jedynie około 2% całej populacji limfocytów w organizmie człowieka (107). Dodatkowo, w przypadku czynnej gruźlicy limfocyty T specyficzne wobec antygenów *Mycobacterium tuberculosis* są aktywnie rekrutowane do miejsca toczącej się infekcji, co powoduje dalszą redukcję ich liczby we krwi obwodowej (108). Proces ten może doprowadzić w efekcie do sytuacji, w której liczba uczulonych limfocytów T w tym kompartmentcie będzie zbyt mała do tego, aby dać wymierną odpowiedź na zakażenie mierzoną testem QFT. Zwraca uwagę zgodność otrzymanej w badaniu czułości testu z wynikami przedstawionymi w metaanalizie Diela (95). Wyliczona przez niego średnia czułość testu wynosiła 81%, co jest wartością bardzo zbliżoną do otrzymanej w niniejszym badaniu (82%). Co ciekawe, na podstawie tej metaanalizy obliczono, że średnia czułość testów przeprowadzonych w krajach rozwijających się wynosiła tylko 74,3%, podczas gdy ten sam parametr w krajach rozwiniętych gospodarczo wynosił 84,5%.

Specyficzność testu obliczona dla całej badanej grupy (927 osób) na podstawie otrzymanych wyników wynosi 71,0% jako testu potwierdzającego

gruźlicę i 65,9% jako testu wykluczającego. Na tak niską specyficzną testu wpływa stosunkowo duża liczba przypadków pacjentów z wynikiem dodatnim testu QFT wśród chorych z rozpoznaniem innym niż gruźlica (29%). Przyczyny takiego stanu rzeczy można upatrywać w następujących przyczynach:

- rozkładu wieku pacjentów w badanej grupie
- specyfiki badanej grupy.

Mówiąc o rozkładzie wieku w badanej grupie należy zwrócić uwagę na to, że wśród pacjentów z rozpoznaniem innym niż gruźlica dominowały osoby starsze. Mediana wieku dla tej grupy wynosiła 58 lat, ale I kwartyl to aż 48 lat. Porównując grupy z wynikiem dodatnim i ujemnym testu QFT wśród pacjentów z rozpoznaniem innym niż gruźlica można zauważyć, że w skład grupy pacjentów z wynikiem dodatnim wchodzi większa liczba osób starszych, niż w przypadku grupy z wynikiem ujemnym (I kwartyl 52,0 vs. 43,8 lat, mediana 61,0 vs. 57,0 lat). Można ten fakt uznać za „populacyjny ślad” przebytego zakażenia. Dzieciństwo osób mających dzisiaj ponad 50 lat przypadało na lata, gdy zapadalność na gruźlicę wynosiła w Polsce w całej populacji 290/100.000, zaś wśród dzieci do 14 roku życia ponad 180/100.000 (12). Odsetek zakażonych dzieci w roku 1953 szacowano na 83,3% wśród dziewcząt i 87,7% wśród chłopców (10). Zakażenie prątkiem gruźlicy mierzone wynikiem testu QFT rzadko zaś ulega negatywizacji. Nawet w przypadku aktywnych postaci gruźlicy leczonych z sukcesem klinicznym, w większości badanych przypadków po zakończonym leczeniu utrzymywał się wynik dodatni (109, 110). Można sądzić, że odsetek zakażonych będzie zmniejszał się z upływem czasu, co potwierdzają badania amerykańskie (111). Mówiąc o specyfice badanej grupy należy zwrócić uwagę na to, że wielu pacjentów objętych badaniem, ze względu na charakter schorzeń jest wielokrotnie hospitalizowanych na oddziałach

pulmonologicznych, a przez to dodatkowo narażonych na zakażenie poprzez kontakt z osobami chorymi na gruźlicę hospitalizowanymi jednocześnie.

W trakcie analizy statystycznej uzyskanych wyników zwrócono uwagę na wysoką ujemną wartość predykcyjną testu 91,8% (95% CI: 89,2 – 94,0) w przypadku traktowania testu jako potwierdzającego gruźlicę i aż 93,0% (95 CI: 90,5 – 95,1%) w przypadku traktowania go jako testu wykluczającego. Niska, zaledwie 40 procentowa dodatnia wartość predykcyjna testu wskazuje na niewielką przydatność testu w potwierdzaniu choroby. Nasuwa to jednoznaczny wniosek, że miejscem stosowania testu QFT w diagnostyce różnicowej aktywnych postaci gruźlicy jest użycie go jako testu służącego wykluczeniu rozpoznania tej choroby. Takie podejście - wykorzystania testu w diagnostyce aktywnej gruźlicy jako testu wykluczającego tę chorobę zgodne jest z podejściem innych autorów (85).

W przypadku aktywnej gruźlicy, wskutek zjawisk opisanych wcześniej, można mieć do czynienia z fałszywie ujemnym wynikiem testu QFT. Co więcej, otrzymane wyniki wskazują, że zaawansowanie choroby mierzone dodatnim wynikiem bakterioskopii rzutuje na odsetek wyników fałszywie ujemnych. W grupie pacjentów z takim wynikiem odsetek pacjentów z dodatnim wynikiem bakterioskopii ($20/36 = 55,6\%$) jest znacznie wyższy niż w grupie z poprawnie oznaczonym, dodatnim wynikiem testu QFT ($45/154 = 29,2\%$). Spostrzeżenie to było przyczynkiem do podjęcia próby obliczenia parametrów czułości i specyficzności dla łącznie traktowanych testów: QFT oraz bakterioskopii. Takie opracowanie wyników zaowocowało znaczną poprawą parametrów, zwłaszcza czułości (wzrost do 92,0%, 95% CI: 87,3 – 95,4%), oraz ujemnej wartości predykcyjnej (wzrost do 96,8%, 95% CI: 94,5 – 98,1%). Tego rodzaju podejście przedstawili również Ravn i wsp. (82) uzyskując wyniki zbieżne z otrzymanymi w niniejszym badaniu.

Inni autorzy podejmowali próby łącznego wykorzystania wyników testu QFT oraz różnych testów/badań dla poprawienia wartości diagnostycznej tak stosowanych testów. Stosowano na przykład w tym celu łączne badanie testem QFT oraz tuberkulinowym odczynem skórnym (83). Wydaje się, że wobec wcześniej przedstawionych zastrzeżeń co do wartości diagnostycznej tuberkulinowego testu skórnego w polskiej populacji wielokrotnie szczepionej szczepionką BCG, badanie tego wariantu jest pozbawione sensu. Jeśli chodzi o próby testów *stricto* laboratoryjnych to na uwagę zasługuje praca Kabeera i wsp. (88), w której badano przydatność łącznie traktowanych: testu QFT i pomiaru białka IP.

W badanej grupie stwierdzono stosunkowo wysoki odsetek wyników „nieokreślonych”, wynoszący 5% w grupie chorych na gruźlicę i 5,1% w grupie chorych z innymi rozpoznaniem. Z tej grupy (47 pacjentów) tylko u 8 osób wynik „nieokreślony” był rezultatem podwyższonego stężenia endogennego interferonu gamma, u pozostałych 39 pacjentów zaś był rezultatem braku reaktywności na stymulację mitogenem, a więc były to osoby z pierwotnym lub wtórnym niedoborem w zakresie odporności komórkowej. Biorąc pod uwagę bardzo dobrze kontrolowany przebieg całej procedury analitycznej, od etapu pobrania krwi do oznaczenia stężenia interferonu, należy przyjąć, że jest to realny odsetek takich osób w badanej grupie. W innych badaniach odsetek ten wahał się w granicach od 0 (112) do 34% (113). Rozbieżność tych danych potwierdza tezę, że analizując wyniki testu QFT zawsze należy brać pod uwagę rodzaj populacji, w jakiej badanie się przeprowadza. Pierwsze z cytowanych badań dotyczy bowiem osób młodych i zdrowych, drugie zaś osób zakażonych wirusem HIV. W każdej z tych populacji wartość predykcyjna testu będzie zupełnie odmienna.

Następnym krokiem zmierzającym w kierunku optymalnego wykorzystania testu była próba określenia wartości *cut-off* stosowanej dla różnicowania wyników dodatnich i ujemnych. Tego rodzaju podejście stosowali również inni badacze sugerując obniżenie ustalonej przez producenta testu wartości wynoszącej 0,35 I.U. IFN-gamma/ml surowicy (73, 114). Bardzo interesujący pogląd przedstawili Costa i wsp.: zaproponowali oni określenie wartości w zakresie 0,2 – 0,7 I.U. interferonu-gamma jako „szarej strefy” wyników o niepewnym statusie (70).

Aby określić optymalną wartość *cut-off* przeprowadzono analizę z wykorzystaniem krzywych ROC. Optymalne parametry statystyczne otrzymano dla wartości *cut-off* wynoszącej 0,20 I.U./ml. Zmiana wartości *cut-off* spowodowała reklasyfikację 48 przypadków z grupy wyników ujemnych do grupy wyników dodatnich. W wyniku tego czułość testu wzrosła z 82% do 89,5% (o 7,5%) przy jednoczesnym obniżeniu specyficzności z 65,9% do 61,5% (o 4,4%). Równocześnie ujemna wartość predykcyjna testu wzrosła z 93,0% do 95,5%. Podane liczby dotyczą wykorzystania testu jako testu wykluczającego. W wariacie analizie wykorzystującym łącznie badanie QFT i bakterioskopię uzyskano wzrost czułości testu do 94%, a wzrost ujemnej wartości predykcyjnej do 97,4%. Oznacza to wzrost czułości w takim wariacie o 2%, a wzrost ujemnej wartości predykcyjnej o 0,6%.

Otrzymane wyniki wskazują jednoznacznie, że:

- test QFT dla uzyskania maksymalnej korzyści w procesie diagnostyki różnicowej czynnych postaci gruźlicy płuc powinien być stosowany jako test wykluczający tę chorobę;
- wynik „nieokreślony” testu powinien być traktowany jako wynik nieprawidłowy (nie – ujemny);

- równoległe z badaniem QFT musi być prowadzona diagnostyka mikrobiologiczna (bakterioskopia i hodowla);
- zasadne wydaje się obniżenie wartości *cut-off* testu do 0,2 I.U./ml.

Stwierdzona przy takim wykorzystaniu testu ujemna wartość predykcyjna 97,4% (95% CI: 95,5% - 98,6%) oznacza, że spośród każdego stu przebadanych pacjentów, u których stwierdzono ujemny wynik testu QFT oraz ujemny wynik bakterioskopii, tylko u trzech inne badania mikrobiologiczne potwierdzą gruźlicę.

Podjęto również próbę wykorzystania składowych parametrów testu QFT (stężenia endogennego interferonu-gamma i stężenia interferonu wydzielanego po stymulacji mitogenem) do różnicowania wyników potwierdzających/wykluczających gruźlicę w obrębie grupy wyników dodatnich i ujemnych tego testu. Wyniki wstępnej analizy były obiecujące, gdyż stwierdzono, że rozkład wyników oznaczenia endogennego interferonu-gamma różnił się w sposób istotny statystycznie pomiędzy pacjentami z rozpoznaniem gruźlicy płuc i pacjentami z rozpoznaniem innymi niż gruźlica zarówno w grupie wyników ujemnych ($p = 0,0084$) jak i dodatnich ($p = 0,004$). Podobne porównanie wyników oznaczenia stężenia interferonu-gamma uwalnianego po stymulacji mitogenem wykazało istotną statystycznie różnicę tylko w przypadku wyników dodatnich ($p < 0,0001$). Mediana wartości stężenia endogennego interferonu-gamma była wyższa w grupie pacjentów z rozpoznaniem gruźlicy płuc niż w grupie pacjentów z rozpoznaniem innymi niż gruźlica niezależnie od tego, czy porównania dokonano dla wyników dodatnich czy ujemnych testu QFT. Świadczy to o uruchomieniu mechanizmów obrony nieswoistej. Wartość liczbowa tej różnicy mieszcząca się w zakresie wielkości błędu analitycznego metody (0,02 – 0,03 I.U./ml) nasuwa jednakże wątpliwość co do możliwości wykorzystania tego parametru dla różnicowania rozpoznań gruźlicy.

Odwrotnie sytuacja kształtowała się w przypadku różnicy stężeń interferonu wydzielanego po stymulacji mitogenem. W tym przypadku mediana wartości stężenia interferonu była wyższa w grupie pacjentów z rozpoznaniem chorób innych niż gruźlica. Taki wynik można tłumaczyć opisanym wcześniej zjawiskiem rekrutacji efektorowych limfocytów do ognisk zakażenia. Różnica mediany w tym przypadku wynosiła aż 3,38 I.U./ml, co pozwalało sądzić, że ten parametr będzie mógł zostać wykorzystany analitycznie do różnicowania chorych na gruźlicę od chorych z innymi chorobami płuc w obrębie grupy pacjentów z dodatnim wynikiem testu QFT. Aby określić wartość dyskryminacyjną opisanych parametrów dla różnicowania rozpoznań przeprowadzono analizę krzywych ROC, oceniając pole powierzchni pod krzywą ROC. Otrzymane we wszystkich trzech analizowanych przypadkach wartości wykluczyły jednak możliwość wykorzystania tych parametrów w założonym celu. W każdym bowiem badanym wariancie dolna granica 95% przedziału ufności nie przekraczała wartości 0,6, zatem pomimo zauważalnej (i statystycznie istotnej) w badanych populacjach różnicy ma ona rozkład bliski losowemu (103).

Wykonane badania oraz analiza ich wyników pokazują aktualne miejsce stosowania testu QFT w schemacie diagnostycznym gruźlicy płuc u pacjentów dorosłych. Należy podkreślić, że jest to analiza aktualna dla określonego miejsca i czasu. Jak podkreślają inni autorzy czułość i specyficzność testu ściśle zależą od populacji, w której test jest stosowany (87). Kontrowersyjnie brzmi ich pogląd, że w populacjach „niskiego ryzyka” test QFT jest przydatny w diagnostyce zarówno latentnych jak i aktywnych postaci gruźlicy, bez potrzeby wykonywania dalszych badań. W pełni natomiast można się zgodzić z ich opinią, że w innych populacjach test QFT powinien być stosowany do diagnostyki aktywnych postaci gruźlicy tylko jako test uzupełniający i wspomagający diagnostykę mikrobiologiczną.

Wykonane przez autora niniejszej pracy obliczenia statystyczne miałyby inny wynik w przypadku analizowania przypadków gruźlicy w szpitalu niespecjalistycznym, gdzie należałoby spodziewać się mniejszej liczby pacjentów zakażonych bez objawów czynnej gruźlicy, która to sytuacja wpłynęłaby na wzrost specyficzności badania. Również w przyszłości, w miarę wchodzenia w wiek dorosły pacjentów urodzonych w warunkach znacznie lepszej sytuacji epidemiologicznej w zakresie gruźlicy, a co za tym idzie analizowania populacji o niższym odsetku zakażonych, zarówno specyficzność jak i dodatnia wartość predykcyjna testu ulegną zwiększeniu. Zapewne zmieni się wówczas również miejsce testu QFT w schematach diagnostycznych gruźlicy.

6. Wnioski

Sam dodatni wynik testu nie może stanowić definitywnego potwierdzenia aktywnej postaci gruźlicy płuc u pacjentów dorosłych;

Diagnostyka aktywnych postaci gruźlicy płuc bezwzględnie wymaga prowadzenia klasycznej diagnostyki mikrobiologicznej;

Ujemne wyniki równocześnie wykonanego testu QuantiFERON oraz badania bakterioskopowego z bardzo dużym prawdopodobieństwem wykluczają aktywną postać gruźlicy płuc;

W badanej populacji wskazane byłoby obniżenie wartości *cut-off*;

Nie stwierdzono możliwości diagnostycznego wykorzystania parametrów składowych testu;

Test QuantiFERON-TB Gold In Tube jest dobrym narzędziem diagnostycznym wspomagającym diagnostykę różnicową chorób płuc.

7. Streszczenie w języku polskim

Wstęp

Prątek *Mycobacterium tuberculosis* zakaża 1/3 ludności globu ziemskiego. Wywołana prątkiem gruźlica była przyczyną śmierci przeszło 1,5 miliona ludzi na świecie w roku 2009. W Polsce, chociaż skala problemu jest dużo mniejsza (8236 przypadków gruźlicy zarejestrowanych w roku 2009), to ze względu na zakaźny charakter gruźlicy ciągle nie wolno jej lekceważyć. Diagnostyka laboratoryjna gruźlicy jest trudna i czasochłonna. Dlatego należy wykorzystywać wszelkie nowe możliwości i metody diagnostyczne. W ostatnich latach do panelu tych metod weszły testy uwalniania interferonu gamma (testy IGRA). Przedstawicielem tej grupy testów jest QuantiFERON-TB Gold In Tube (QFT). Test ten przeznaczony jest do diagnostyki latentnych zakażeń prątkiem gruźlicy. Jednocześnie od samego początku jego stosowania podejmowano próby jego użycia w diagnostyce aktywnych postaci gruźlicy. Ze względu na supresyjny wpływ gruźlicy na mechanizmy odporności organizmu uzyskiwane wyniki nie są jednoznaczne. W tej sytuacji wydaje się niezbędne podjęcie kontrolowanego badania na populacji miejscowej.

Cel pracy

Celem pracy jest określenie miejsca i znaczenia testu QuantiFERON-TB Gold In Tube w schematach diagnostycznych rozpoznawania zakażeń prątkiem *Mycobacterium tuberculosis* w aktywnej postaci gruźlicy płuc. Cel ten zrealizowano przez:

1. Analizę statystyczną wyników testu QuantiFERON-TB Gold In Tube w odniesieniu do „złotego standardu” w diagnozowaniu aktywnych postaci gruźlicy, jakim jest wynik badań mikrobiologicznych;

2. Określenie optymalnych dla badanej populacji punktów odcięcia różnicujących grupę wyników dodatnich i ujemnych testu;
3. Analizę przydatności pomiaru elementów składowych testu do różnicowania etiologii chorób płuc.

Materiał i metody

W badaniu uczestniczyło 979 pacjentów (381 kobiet w wieku $56,6 \pm 16,6$ lat i 598 mężczyzn w wieku $54,9 \pm 15,8$ lat) hospitalizowanych w Wielkopolskim Centrum Chorób Płuc i Gruźlicy. Materiał do badania stanowiły: krew obwodowa, materiały z dróg oddechowych (plwocina, popłuczyny oskrzelowe, BAL), płyny z jamy opłucnej, tkanka płuca. Pobrana krew służyła do wykonania testu QFT. Pozostałe materiały poddano diagnostyce mikrobiologicznej w kierunku wykrycia prątków gruźlicy: we wszystkich przypadkach wykonano bakterioskopię i hodowlę, dla części materiałów badanie genetyczne testem amplifikacyjnym MTD (Gen-Probe). Pobrane śródoperacyjnie fragmenty tkanek były również poddane diagnostyce technikami histologicznymi. W analizie statystycznej wykorzystano test U Manna-Whitney'a oraz analizę krzywych ROC. Obliczenia wykonano przy pomocy programu Analyse-It.

Wyniki

W badanej populacji stwierdzono 200 osób z gruźlicą potwierdzoną badaniami mikrobiologicznymi lub histologicznymi, 52 osoby z rozpoznaniem gruźlicy opartym na rozpoznaniu klinicznym bez potwierdzenia laboratoryjnego, oraz 727 osób z rozpoznaniem innym niż gruźlica płuc. Najwyższą wartość czułości i ujemnej wartości predykcyjnej (NPV) testu QFT uzyskano włączając grupę wyników „nieokreślonych” do grupy wyników dodatnich testu. Czułość testu wynosiła wówczas 82%, NPV 93%. Równoczesna analiza wyników testu QFT oraz bakterioskopii podwyższyła te parametry do następujących wartości: czułość – 92%, NPV – 96,8%.

W obydwóch wariantach analizy test wykazywał stosunkowo niskie wartości specyficzności i dodatniej wartości predykcyjnej. Analiza krzywej ROC wykazała, że optymalne parametry statystyczne dla badanej populacji test QFT przyjmuje przy wartości cut-off 0,20 I.U./ml (wobec wartości 0,35 I.U./ml wyznaczonej przez producenta testu). Przeprowadzona analiza krzywych ROC dla składowych parametrów testu QFT (stężenia endogennego interferonu gamma oraz stężenia interferonu uwalnianego po stymulacji mitogenem) wykazała wartości pola powierzchni pod krzywą w zakresie 0,59 do 0,65, co wyklucza możliwość praktycznego stosowania tych parametrów dla różnicowania chorych z gruźlicą od chorych z rozpoznaniem innymi niż gruźlica.

Wnioski

1. Sam dodatni wynik testu nie może stanowić definitywnego potwierdzenia aktywnej postaci gruźlicy płuc u pacjentów dorosłych;
2. Diagnostyka aktywnych postaci gruźlicy płuc bezwzględnie wymaga prowadzenia klasycznej diagnostyki mikrobiologicznej;
3. Ujemne wyniki równocześnie wykonanego testu QuantiFERON oraz badania bakterioskopowego z bardzo dużym prawdopodobieństwem wykluczają aktywną postać gruźlicy płuc;
4. W badanej populacji wskazane byłoby obniżenie wartości *cut-off* ;
5. Nie stwierdzono możliwości diagnostycznego wykorzystania parametrów składowych testu;
6. Test QuantiFERON-TB Gold In Tube jest dobrym narzędziem diagnostycznym wspomagającym diagnostykę różnicową chorób płuc.

8. Streszczenie w języku angielskim

Introduction

An estimated 1/3 of the world population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*. In 2009 tuberculosis was the cause of death of close to 1.5 million people worldwide. Although the scale of the problem is much smaller in Poland (8,236 cases of active tuberculosis (TB) in 2009), it should not be neglected due to the fact that TB is an infectious disease. Laboratory diagnosis of TB is difficult and time consuming, thus it is crucial to use all available modern diagnostic technologies in the process of identifying the disease. In recent years the spectrum of diagnostic tools was broadened with the appearance of the Interferon Gamma Release Assay tests (IGRA tests) such as QuantiFERON – TB Gold in Tube (QFT). These tests are particularly designed to diagnose latent infection with *M. tuberculosis*, nevertheless they have also been used as an aid in diagnosing TB. However, due to the immune-suppressive effect of TB on the human immune system the results are sometimes ambiguous. In this situation it seems valuable to conduct a controlled study on the population of local patients.

Aim of the Study

The aim of the study is to define the place and significance of QFT in the diagnostic schemes of identifying infections of *Mycobacterium tuberculosis* in TB.

The aim of this study was achieved by:

1. Statistical analysis of the results of QFT compared to the “gold standard” in active TB diagnosis which is the microbiological investigation.
2. Defining an optimal cut-off values differentiating negative and positive results for the studied population.

3. Analysis of the usefulness of the results of partial components of the test to differentiate the etiology of different lung diseases.

Materials and Methods

979 patients (381 women aged 56.6 ± 16 years and 598 men aged 54.9 ± 15.8 years) hospitalized in Wielkopolska Center of Pulmonology and Thoracosurgery, Poznań, Poland, were studied. The materials taken for study were peripheral blood, materials from the respiratory tracts (sputum, bronchial lavage, BAL), pleural fluid and lung tissue. The blood was analyzed with QFT. The other materials were analyzed in a microbiological laboratory to detect *M. tuberculosis*. All specimens were analyzed with microscopy and cultured. Some of the specimens were analyzed with amplification MTD tests (Gen-Probe). Tissue samples were parallel diagnosed by an experienced histo-pathologist. Mann-Whitney's U test and ROC curves analyses were employed to statistically analyze the obtained data. All calculations were performed using Analyse-It software.

Results

In the investigated population 200 patients were diagnosed with active TB confirmed by microbiological or histological means, 52 patients with active TB diagnosis based on clinical symptoms only (not confirmed by microbiological laboratory), and 727 patients diagnosed with disease other than TB. The highest sensitivity and negative predictive value (NPV) was achieved when the indeterminate results were treated as positive results. In this case the sensitivity was 82% and NPV 93%. Concurrent analysis of QFT result and microscopic diagnosis increased the sensitivity to 92% and NPV to 96.8%. Both scenarios were characterized by low specificity and positive predictive value (PPV) of the QFT test. ROC curve analysis shows that the optimal cut-off point for the studied population was 0.20 I.U./ml

(compared to 0.35 suggested by the manufacturer of the QFT test). Results of ROC curve analysis (values of the area under the curve were in the range from 0.59 to 0.65) for the partial components of the test (the amount of the endogenic interferon gamma and the amount of the interferon gamma released after stimulation with mitogen), excludes their practical application in differentiating active TB from other lung diseases.

Conclusions

1. Positive QFT result on its own cannot be used to confirm active TB in adults.
2. Diagnosing active TB requires the use of microbiological analysis.
3. Negative results of both QFT test and microscopy with high degree of probability exclude active TB.
4. It seems feasible to reduce the cut-off value in the studied population of patients.
5. There is no application for the analysis of the results partial components of the QFT test in diagnosing active TB.
6. QuantiFERON-TB Gold In Tubes is useful diagnostic tool which helps with differential diagnosis of TB and other lung diseases.

9. Piśmiennictwo

1. Boruń M, Pawłowska I, Zwolska Z, Jaworski A. Współczesne metody diagnozowania gruźlicy. *Post Mikrobiol.* 2000; 39: 17-36.
2. Kappelman J, Alcicek MC, Kazanc N, Schultz M, Ozkul M, Sen S. First Homo erectus from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia. *Am J Phys Anthropol.* 2008; 135: 110-116.
3. Spigelman M, Lemma E. The use of polymerase chain reaction (PCR) to detect *Mycobacterium tuberculosis* in ancient skeletons. *Int J Osteoarcheol.* 1993; 3: 137-143.
4. Zink AR, Haas CJ, Reischl U, Szeimies U, Nerlich AG. Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. *J Med Microbiol.* 2001; 50: 355-366.
5. Hershkovitz I, Donoghue HD, Minnikin DE, Besra GS, Lee OY-C, et al. 2008 Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean. *PLoS ONE* 3(10): e3426. doi:10.1371/journal.pone.0003426
6. Seyda B. Dzieje medycyny w zarysie. Wyd. 2. Warszawa: Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich; 1973: 42-43.
7. Zwolska Z. Robert Koch twórca bakteriologii chorób zakaźnych. Gdańsk: Via Medica; 2006.
8. Koch R. Nobel Lecture. Dostępny na URL: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1905/koch-lecture.html
9. World Health Organization. Global tuberculosis control 2010. Dostępny na URL: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069_eng.pdf

10. Szczuka I. Epidemiologia gruźlicy. W: Rowińska-Zakrzewska E, red. Gruźlica w praktyce lekarskiej. Wyd. 1. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2000: 32-48.
11. EuroTB and the national coordinators for tuberculosis surveillance in the WHO European Region. Surveillance of tuberculosis in Europe. Report on tuberculosis cases notified in 2006. Dostępny na URL: http://www.eurotb.org/rappports/2006/full_report.pdf
12. Korzeniewska-Koseła M, red. Gruźlica i choroby układu oddechowego w Polsce w 2009 roku. Warszawa: Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc; 2010.
13. World Health Organization. The global plan to stop TB. Dostępny na URL: <http://www.stoptb.org/global/plan/>
14. Jakubowiak W, Korzeniewska-Koseła M, Kuś J, Michałowska-Mitczuk D, Wesółowski S, Ziegman M, Zwolska Z. Podręcznik gruźlicy – zalecenia NPZG. Wyd. 1. Warszawa: Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc; 2001: 7-44.
15. World Health Organization. Pursue high-quality DOTS expansion and enhancement. Dostępny na URL: <http://www.who.int/tb/dots/en/>
16. American Thoracic Society. Diagnostic Standards and Classification of tuberculosis in adults and children. Am J Respir Crit Care Med. 2000; 161: 1376-1395.
17. Madison BM. Application of stains in clinical microbiology. Biochem Histochem. 2001; 76: 119-125.
18. Steigart KR, Henry M, Ng V, Hopewell AR, Cunningham J, Urbanczyk R, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. Lancet Infect Dis. 2006; 6: 570-581.

19. Piasecka-Zeyland E. Prątek gruźlicy. W: Ławrynowicz A, Legeżyński S, Przesmycki F, red. Mikrobiologia lekarska. Zeszyt III. Warszawa: Lekarski Instytut Naukowo-Wydawniczy; 1948.
20. Loewenstein E. Culture of tubercle bacilli from blood. (transl. from: Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt I Orig. 1931; 120: 127–129). Int J Tuberc Lung Dis. 2008; 12: 1380-1381.
21. Becton-Dickinson. BBL™ Lowenstein-Jensen Medium. Product insert. Dostępny na URL: <http://www.bd.com/ds/productCenter/220908.asp>
22. Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro A, Tosi CP, Nista D, Bornigia S, et al. Comparison of MB/Bact Alert 3D system with radiometric BACTEC system and Loewenstein-Jensen recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. J Clin Microbiol. 2001; 39: 651-657.
23. Willians-Bouyer N, Yorke R, Lee HI, Woods GL. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. J Clin Microbiol. 2000; 38: 4167-4170.
24. Aggarwal P, Singal A, Bhattacharya SN, Mishra N. Comparison of the radiometric BACTEC 460 TB culture system and Loewenstein-Jensen medium for the isolation of mycobacteria in cutaneous tuberculosis and their drug susceptibility pattern. Int J Dermatol. 2008; 47: 681-687.
25. Sorlozano A, Soria I, Roman J, Huertas P, Soto MJ, et al. Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples. J Microbiol Biotechnol. 2009; 19: 1259-1264.
26. Gruszczyński P. Mikrobiologiczne metody wykrywania gruźlicy. 2006; Przewodnik lekarza. Supl. 1: 16-20.

27. Brisson-Noel A, Lecossier D, Nassif X, Gicquel B, Levy-Frebault V, Hance AJ. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *Lancet*. 1989; 334: 1069-1071.
28. Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z. Postępy w diagnostyce i epidemiologii molekularnej *Mycobacterium tuberculosis*. *Post Mikrobiol*. 2010; 49: 151-156.
29. Walker GT, Little MC, Nadeau JG, Shank DD. Isothermal *in vitro* amplification of DNA by restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proc Natl Acad Sci*. 1992; 89: 392-396.
30. American Thoracic Society. Rapid diagnostic tests for tuberculosis. What is the appropriate use? *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155: 1804-1814.
31. Coll P, Garrigo M, Moreno C, Marti N. Routine use of Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) Test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* with smear-positive and smear-negative specimens. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003; 7: 886-891.
32. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med*. 2010; 363: 1005-1015.
33. World Health Organization. Roadmap for rolling out Xpert MTB/Rif for rapid diagnosis of TB and MDR-TB. Dostępny na URL: http://www.who.int/tb/laboratory/roadmap_xpert_mtb_rif_rev23dec2010.pdf
34. World Health Organization. International statistical classification of diseases and related health problems. 10th edition. Dostępny na URL: <http://apps.who.int/classification/apps/icd/icd10online/>

35. Cutler RR, Baithun SI, Doran HM, Wilson P. Association between the histological diagnosis of tuberculosis and microbiological findings. *Tuber Lung Dis.* 1994; 75: 75-79.
36. Yew WW, Kwan SY, Wong PC, Fu KH. Percutaneous transthoracic needle biopsies in the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Lung.* 1991; 169: 285-289.
37. Palenque E, Amor E, Bernaldo de Quiros JC. Comparison of bronchial washing, brushing and biopsy for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol.* 1987; 6:191-192.
38. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, red. *Patologia.* Wydanie I polskie, Olszewski WT, red. Wrocław: Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner; 2005: 554-560.
39. The histology of tuberculosis. Dostępny na URL: <http://www0.sun.ac.za/ortho/webct-ortho/tb/tb-histology.html>
40. Teixeira HC, Abramo C, Munk ME. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. *J Bras Pneumol.* 2007; 33: 323-334.
41. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 2004; 120: 213-232.
42. Arloing S, Courmont P. Serum diagnosis of tuberculosis. *Boston Med Surg J.* 1904; 151: 617-623.
43. Jackett PS, Bothamley GH, Batra HV, Mistry A, Young DB, Ivanyi J. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1988; 26: 2313-2318.
44. Mukhopadhyay A, Guan M, Chen HY, Lu Y, Lim TK. Prospective study of a new serological test (ASSURE TM TB Rapid Test) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006; 10: 620-624.

45. Gennaro ML. Immunologic diagnosis of tuberculosis. Clin Infect Dis. 2000; 30 (suppl. 3): S243-S246.
46. Brown RM, Cruz O, Brennan M, Gennaro ML, Sclesinger L, Skeiky YAW, Hoft DF. Lipoarabinomannan-reactive human secretory immunoglobulin A responses induced by mucosal Bacilli Calmette-Guerin vaccination. J Infect Dis. 2003; 187: 513-517.
47. Mackaness GB. The immunological basis of acquired cellular resistance. J Exp Med. 1964; 120: 105-120.
48. Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr, The tuberculin skin test. Clin Infect Dis. 1993; 17: 968-975.
49. Curley C. New guidelines: what to do about an unexpected positive tuberculin skin test. Clev Clin J Med. 2003; 70: 49-55.
50. Sleiman R, Al-Tanir M, Dakdouki G, Ziade F, Assi NA, Rajab M. Interpretation of the tuberculin skin test in Bacilli Calmette-Guerin vaccinated and nonvaccinated school children. 2007; 26: 134-138.
51. Wang L, Turner MO, Elwood RK, Schulzer M, FitzGerald JM. A meta-analysis of the effect of Bacilli Calmette-Guerin vaccination on tuberculin skin test measurement. Thorax. 2002; 57: 804-809.
52. Diel R, Ernst M, Doscher G, Visuri-Karbe L, Greinert U, et al. Avoiding the effect of BCG vaccination in detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection with a blood test. 2006; 28: 16-23.
53. Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D. False-positive tuberculin skin test: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? Int J Tuberc Lung Dis. 2006; 10: 1192-1204.

54. Gruszczyński P, Ozorowski T. Znaczenie diagnostyczne próby tuberkulinowej w populacji szczepionej BCG. *Pol Merk Lek.* 2010; 29: 162-164.
55. Brosch R, Gordon SV, Pym A, Eiglmeier K, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microb.* 2000; 290: 143-152.
56. Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1995; 63: 1710-1717.
57. Dillon DC, Alderson MR, Day CH, Bement T, Campos-Neto A, Skeiky YA, et al. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis* (BCG). *J Clin Microbiol.* 2000; 38:3285-3290.
58. Lalvani A, Thillai M. Diagnosis of tuberculosis: principles and practice of using interferon- γ release assays (IGRAs). *Breathe.* 2009; 5: 303-309.
59. Mazurek M, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K. Updated guidelines for using Interferon Gamma Release Assays to detect *Mycobacterium tuberculosis infection* - United States, 2010. *MMWR Recomm Rep.* 2010 Jun 25;59(RR-5): 1-25.
60. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis. Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC. *MMWR Recomm Rep.* 2005 Dec 16;54(RR-15):1-47.
61. The National Institute for Health and Clinical Excellence. Clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. Dostępny na URL: <http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/12193/51951/51951.pdf>

62. Canadian Tuberculosis Committee. Updated recommendations on interferon gamma release assays for latent tuberculosis infection. *Can Commun Dis Rep* 2008; 34 (ACS-6): 1-13.
63. Huang Y-W, Shen G-H, Lee J-J, Yang W-T. Latent tuberculosis infection among close contacts of multidrug-resistant tuberculosis patients in central Taiwan. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010; 14: 1430-1435.
64. Higuchi K, Harada n, Mori T, Sekiya Y. Use of QuantiFERON-TB Gold to investigate tuberculosis contacts in a high school. *Respirology*. 2007; 12:88-92.
65. Connell TG, Curtis N, Ranganathan SC, Buttery JP. Performance of whole blood interferon gamma assay for detecting latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* in children. *Thorax*. 2006; 61: 616-620.
66. Yoshiyama T, Harada N, Higuchi K, Sekiya Y, Uchimura K. Use of QuantiFERON-TB Gold test for screening tuberculosis contacts and predicting active disease. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010; 14: 819-827.
67. Lienhardt C, Fielding K, Hane AA, Niang A, Ndao CT, et al. (2010) Evaluation of the prognostic value of IFN- γ release assay and tuberculin skin test in household contacts of infectious tuberculosis cases in Senegal. *PLoS ONE* 5(5): e10508. doi:10.1371/journal.pone.0010508
68. Schablon A, Harling M, Diel R, Nienhaus A. Risk of latent TB infection in individuals employed in the healthcare sector in Germany: a multicentre prevalence study. *BMC Infect Dis*. 2010; 10: 107.
69. Escombe AR, Huaroto L, Ticona E, Burgos M, Sanchez I, et al. Tuberculosis transmission risk and infection control in a hospital emergency department in Lima, Peru. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010; 14: 1120-1126.

70. Costa JT, Silva R, Sa R, Cardoso MJ, Nienhaus A. Serial testing with the interferon- γ release assay in Portuguese healthcare workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 2010; doi: 10.1007/s00420-010-0571-x
71. Demkow U, Broniarek-Samson B, Filewska M, Lewandowska A, Maciejewski J, et al. Prevalence of latent tuberculosis infection in health care workers in Poland assessed by interferon-gamma whole blood and tuberculin skin tests. *J Physiol Pharmacol*. 2008; 59 (suppl. 6): 209-217.
72. Pai M, Gokhale K, Joshi R, Dogra S, Kalantri S, et al. Mycobacterium tuberculosis infection in health care workers in rural India. *JAMA*. 2005; 293: 2746-2755.
73. Maeda T, Banno S, Maeda S, Naniwa T, Hayami Y, et al. Usefulness and limitations of QuantiFERON-TB Gold in Japanese rheumatoid arthritis patients: proposal to decrease the lower cutoff level for assessing latent tuberculosis infection. *Mod Rheumatol*. 2010; 20: 18-23.
74. Inanc N, Zehraaydin S, Karakurt S, Atagunduz P, Yavuz S, et al. Agreement between QuantiFERON-TB Gold test and tuberculin skin test in the identification of latent tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *J Rheumatol*. 2009; 36:12; doi:10.3899/jrheum.090268
75. Beglinger C, Dudler J, Mottet C, Nicod L, Seibold F, et al. Screening for tuberculosis infection before initiation of anti-TNF- α therapy. *Swiss Med Wkly*. 2007; 137: 621-622.
76. Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Burmester GR, et al. Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases, 2006. *Ann Rheum Dis*. 2006; 65 (suppl. III): iii2-iii15.

77. Korzeniewska-Koseła M. Zapobieganie gruźlicy u chorych leczonych antagonistami czynnika martwicy nowotworów. *Reumatologia*. 2010; 48: 4-13.
78. Kucharz EJ, Korzeniewska-Koseła M, Kotulska A. Zalecenia postępowania w zapobieganiu i leczeniu gruźlicy u chorych leczonych antagonistami TNF- α . *Reumatologia*. 2008; 46: 51-54.
79. Talati NJ, Seybold U, Humphrey B, Aina A, Tapia J, et al. Poor concordance between interferon- γ release assays and tuberculin skin test in diagnosis of latent tuberculosis infection among HIV-infected individuals. *BMC Infect Dis*. 2009, 9: 15. doi:10.1186/1471-2334-9-15
80. Mutsvangwa J, Millington KA, Chaka K, Mavhudzi T, Cheung Y-B, et al. Identifying recent *Mycobacterium tuberculosis* transmission in the setting of high HIV and TB burden. *Thorax*. 2010; 65: 315-320.
81. Davies M-A, Connell S, Johannisen C, Wood K, Pienaar S, et al. Detection of tuberculosis in HIV-infected children using an enzyme-linked immunospot assay. *AIDS*. 2009; 23: 961-969.
82. Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JB, et al. Prospective evaluation of a whole blood test using *Mycobacterium tuberculosis*- specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005; 12: 491-496.
83. Britton WJ, Gilbert GL, Wheatley J, Leslie D, Rothel JS, et al. Sensitivity of human gamma interferon assay and tuberculin skin testing for detecting infection with *Mycobacterium tuberculosis* in patients with culture positive tuberculosis. *Tuberculosis*. 2005; 85: 137-145.

84. Dewan PK, Grinsdale J, Kawamura LM. Low sensitivity of a whole-blood interferon-gamma release assay for detection of active tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2007; 44: 69-73.
85. Kang YA, Lee HW, Hwang SS, Um S-W, Han SK, et al. Usefulness of whole-blood interferon- γ enzyme-linked immunospot assay in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Chest.* 2007; 132: 959-965.
86. Rutheford M, Alisjahbana B, Maharani W, Sampurno H, van Crevel R, Hill PC. (2010) Sensitivity of the QuantiFERON-gold in tube assay in sputum smear-positive cases in Indonesia. *PLoS ONE* 5(8): e12020. doi:10.1371/journal.pone.0012020
87. Tahereh K, Alireza N, Massoud S, Amina K. A validity of the QuantiFERON-TB Gold (QFT-TB) method for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in a high risk population. *Swiss Med Wkly.* 2010; 140: 95-96.
88. Kabeer BSA, Raman B, Thomas A, Perumal V, Raja A. (2010) Role of QuantiFERON-TB Gold, interferon gamma inducible protein-10 and tuberculin skin test in active tuberculosis diagnosis. *Plos ONE* 5(2):e9051. doi:10.1371/journal.pone.0009051
89. Goletti D, Raja A, Ahamed Kabeer BS, Rodrigues C, Sodha A, et al. IFN γ , but not ip10, mcp2 or il2 response to rd1 selected peptides associates to active tuberculosis. *J Infect.* 2010; doi: 10.1016/j.jinf.2010.05.002
90. Lange C, Pai M, Drobniewski F, Migliori GB. Interferon- γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: sensible or silly? *Eur Respir J.* 2009; 33: 1250-1253.

91. Baba K, Sornes S, Hoosen AA, Lekabe J, Mpe J, et al. Evaluation of Immune Responses in HIV-infected Patients with Pleural Tuberculosis by the QuantiFERON TB-Gold Interferon-gamma assay. *BMC Infect Dis.* 2008; 8: 35.
92. Sauzullo I, Mengoni F, Lichtner M, Massetti AP, Rossi R, et al. (2009) In Vivo and In Vitro Effects of Antituberculosis Treatment on Mycobacterial Interferon- γ T Cell Response. *PLoS ONE* 4(4): e5187. doi:10.1371/journal.pone.0005187
93. Nicol MP, Davies M-A, Wood K, Hatherill M, Workman L, et al. Comparison of T-Spot.TB assay and tuberculin skin test for the evaluation of young children at high risk for tuberculosis in community setting. *Pediatrics.* 2009; 123: 38-43.
94. Kim S-H, Choi S-J, Kim H-B, Kim N-J, Oh M-d, Choe K-W. Diagnostic usefulness of a T-cell-based assay for extrapulmonary tuberculosis. *Arch Intern Med.* 2007; 167: 2255-2259.
95. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Evidence based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active tuberculosis – a meta-analysis. *Chest.* 2010; 137: 952-968.
96. Pirożyński M. Bronchofiberoskopia. Wyd. 1. Bielsko-Biała: α -medica press; 1999: 118-125.
97. Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC. Podstawowe procedury laboratoryjne w bakteriologii klinicznej. Wyd. 1. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2005: 85-87.
98. Gadre DV, Mahajan M, Singh NR, Agarwal DS., Talwar V. Niacin test for mycobacteria: a comparative study of two methods. *Ind J Tub.* 1995; 42: 225-226.

99. Hill CS. Gen-Probe transcription mediated amplification: system principles. Dostępny na URL: http://www.gen-probe.com/pdfs/tma_whiteppr.pdf
100. Zawistowski S. Technika histologiczna. Wyd. V. Warszawa: Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich; 1986: 540-541.
101. Cellestis. QuantiFERON®-TB Gold (metoda próbówkowa). Podręcznik diagnostyczny do testów w warunkach in vitro. . Dostępny na URL: <http://www.cellestis.com/IRM/Company/ShowPage.aspx?CPID=1338>
102. Stanisław A. Podstawy statystyki dla prowadzących badania naukowe. Odcinek 11: Testy nieparametryczne – cz. I. Medycyna Praktyczna. 1999 (9): 175-178.
103. Jaeschke R, Cook D, Guyatt G. Evidence based medicine (EBM), czyli praktyka medyczna oparta na wiarygodnych i aktualnych publikacjach (POWAB). Odcinek 5: Ocena artykułów na temat testów diagnostycznych. Cz. II – metody określania przydatności testu. Medycyna Praktyczna. 1998 (11): 184-191.
104. Niederweis M. Nutrient acquisition by mycobacteria. Microbiology. 2008; 154: 679-692.
105. Zwolska Z. Mikrobiologiczne metody diagnozowania gruźlicy. W: Cegielska-Tomaszewska K, red. Gruźlica u dzieci. Wyd. I. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1996: 30.
106. Browne M, Healy TM. Coexisting carcinoma and active tuberculosis of the lung: 24 patients. Ir J Med Sci. 1982; 151: 75-78.
107. Westermann J, Pabst R. Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body. Clin Investig. 1992; 70: 539-544.
108. Jafari C, Lange C. Sutton's law: local immunodiagnosis of tuberculosis. Infection. 2008; 36: 510-514.

109. Pai M, Joshi R, Dogra S, Mendiratta DK, Narang P, et al. Persistently elevated T cell interferon- γ responses after treatment for latent tuberculosis infection among health care workers in India: a preliminary report. *J Occup Med Toxicol.* 2006; doi: 10.1186/1745-6673-1-7.
110. Markova R, Drenska R, Todorova Y, Terzieva V, Stefanova D. Monitoring of efficacy of anti-TB therapy by using the QuantiFERON-TB Gold In Tube test. *Eur Respir Rev.* 2008; 17: 74-75.
111. Winston C, Navin T. Birth cohort effect on latent tuberculosis infection prevalence, United States. *BMC Infect Dis.* 2010; 10:206.
112. Franken WP, Timmermans JF, Prins C, Sliotman E-JHJ, Dreverman J, et al. Comparison of Mantoux and QuantiFERON TB Gold tests for diagnosis of latent tuberculosis infection in army personnel. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14: 477-480.
113. Baba K, Sornes S, Hoosen AA, Lekabe JM, Mpe MJ, et al. Evaluation of immune responses in HIV infected patients with pleural tuberculosis by the QuantiFERON [®]TB-Gold interferon-gamma assay. *BMC Infect Dis.* 2008; 8: 35.
114. Soysal A, Torun T, Efe S., Gencer H, Tahaoglu K, Bakir M. Evaluation of cut-off values of interferon-gamma-based assays in the diagnosis of M. tuberculosis infection. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008; 12: 50-56.