

Received: 2014.05.26  
Accepted: 2015.05.08  
Published: 2015.10.13

## Współczesna diagnostyka zakażenia prątkiem gruźlicy u dzieci – czy nadal odczyn tuberkulinowy?

The diagnosis of latent tuberculosis infection in children in XXI century. Is tuberculin skin test still up to date?

Teresa Bielecka, Anna Komorowska-Piotrowska, Agnieszka Mazur, Wojciech Feleszko

Klinika Pneumonologii i Alergologii Wieku Dziecięcego, Warszawski Uniwersytet Medyczny

### Streszczenie

Wskaźniki zapadalności na gruźlicę w Polsce od wielu lat systematycznie, choć powoli się obniżają. Nadal jednak co roku stwierdza się około 8 tysięcy zachorowań na gruźlicę, z czego prawie 3 tysiące stanowią chorzy na gruźlicę płuc obficie prątkujący, to znaczy z dodatnim wynikiem bakterioskopii. Wśród dzieci poniżej 14 roku życia w ciągu ostatnich 3 lat odnotowywano około 100 zachorowań na gruźlicę rocznie.

O diagnostyce w kierunku zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* należy pamiętać, gdy dziecko miało kontakt z chorym na gruźlicę płuc lub prezentuje objawy odpowiadające gruźlicy bądź ma planowane leczenie immunosupresyjne. Przesiewowe badania w kierunku zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* obowiązują również pacjentów zakażonych HIV.

Przez ponad 100 lat jedynym testem potwierdzającym infekcję prątkiem gruźlicy był odczyn tuberkulinowy polegający na ocenie reakcji skórnej na śródskórne wstrzyknięcie tuberkuliny. Ze względu na obecność krzyżowej reakcji na tuberkulinę u osób szczepionych BCG prawidłowa interpretacja odczynu często sprawiała trudność.

Od 10 lat są dostępne nowe testy immunologiczne polegające na badaniu stężenia interferonu gamma (interferon gamma release assay, IGRA) po inkubacji krwi pacjenta z antygenami swoistymi dla prątków gruźlicy, nieobecnyymi w szczepie *Mycobacterium bovis* BCG. U osób zakażonych prątkiem gruźlicy obecne we krwi komórki pamięci rozpoznają antygeny prątków i zaczynają intensywnie wydzielać interferon gamma. Wiele badań potwierdza dużą czułość testów IGRA oraz wyższą w porównaniu z odczynem tuberkulinowym swoistość. Wytyczne towarzystw naukowych zalecają coraz szersze stosowanie IGRA, również u dzieci.

### Słowa kluczowe:

*Mycobacterium tuberculosis* • odczyn tuberkulinowy • IGRA • rekomendacje • dzieci • Mtx • odczyn Mantoux • BCG • PPD

### Summary

Tuberculosis morbidity rates in Poland have been gradually decreasing. Nevertheless, there are approximately 8 thousand cases being registered annually, which includes almost 3 thousand massively infectious patients. In the last 3 years, around 100 cases/year have been reported among children below 14 years of age.

Infection with *Mycobacterium tuberculosis* should be considered in all patients who present symptoms suggesting tuberculosis, have had recent contact with a person suffering from lung tuberculosis or are planned to undergo an immunosuppressive treatment. HIV infected

|   |  |
|---|--|
| <b>Keywords:</b>  | <p>patients are also supposed to have screening tests for <i>M. tuberculosis</i> infection performed. For over a 100 years tuberculin skin test (TST) was the only test capable of confirming tuberculous infection. TST is based on the assessment of skin reaction to intracutaneous injection of tuberculin. Due to cross-reaction to the injected tuberculin in BCG vaccinated individuals, the correct interpretation of the test is difficult.</p> <p>Since 13 years new immunological assays have been available. They are based on detecting interferon gamma (Interferon Gamma Release Assay – IGRA) concentration in blood serum, which has previously been incubated with <i>Mycobacterium tuberculosis</i> antigens absent in the BCG strain. In infected individuals interferon gamma is intensively produced by memory cells in reaction to the contact with previously met <i>Mycobacterium</i> antigens. Many trials have proved IGRA's high sensitivity and, higher than TST, specificity.</p> <p>Recent guidelines promote the usage of IGRAs, even in children.</p> |
| <b>Full-text PDF:</b>   | <a href="http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1173910">http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1173910</a>  |
| <b>Word count:</b><br><b>Tables:</b><br><b>Figures:</b><br><b>References:</b> | 2987<br>7<br>2<br>51   |

**Adres autorki:**

dr Teresa Bielecka, Klinika Pneumonologii i Alergologii Wieku Dziecięcego, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Samodzielny Publiczny Dziecięcy Szpital Kliniczny, ul. Żwirki i Wigury 63A, 02-091 Warszawa; e-mail: [teresa.bielecka@wp.pl](mailto:teresa.bielecka@wp.pl)

**Wykaz skrótów:**

**BCG** – Bacterium Calmette-Guerin, **HIV** – ludzki wirus niedoboru odporności (Human Immunodeficiency Virus), **IGRA** – test wydzielania interferonu-gamma (Interferon Gamma-release Assay), **OT** – odczyn tuberkulinowy.

**WSTĘP**

Zapadalność na gruźlicę w Polsce w 2013 r. po raz czwarty w ciągu ostatnich kilku lat była niższa niż 20/100 tys. (17,4/100 000), co umieszcza Polskę w grupie krajów o niskiej zapadalności na tę chorobę [23]. Jednak wskaźniki zapadalności na gruźlicę są wyższe niż w większości krajów zachodnioeuropejskich (np. Niemczech i Francji), gdzie co roku stwierdza się 5-8 zachorowań/100 000 mieszkańców [47].

Lepsza sytuacja epidemiologiczna nie oznacza, że wolno zapomnieć o tej chorobie. Nadal co roku w Polsce odnotowuje się około 8 tysięcy przypadków gruźlicy, a ponad 500 osób umiera z jej powodu. W 2013 r. prawie 3000 chorych na gruźlicę płuc stanowili pacjenci z dodatnim rozmazem płwociny, a więc chorzy obficie prątkujący, wysoce zakaźni [23]. Warto pamiętać, że tuż za naszą wschodnią granicą zapadalność na gruźlicę jest znacznie wyższa (53-93/100 000) [47], a napływ obcokrajowców ze wschodu do Polski, może uniemożliwić utrzymanie obserwowanej tendencji spadkowej.

Wśród dzieci poniżej 14 roku życia w Polsce w ciągu ostatnich 5 lat rocznie odnotowywano 62-116 zachoro-

wań, a współczynnik zapadalności utrzymywał się w tej grupie wiekowej w zakresie 1,1-2/100 000 [23].

Zapadalność na gruźlicę w populacji dziecięcej jest odbiciem sytuacji epidemiologicznej gruźlicy wśród dorosłych. Nowe zachorowania dzieci świadczą o niedawnej transmisji prątków w środowisku i o braku pełnej kontroli nad chorobą [4].

Małe dzieci zakażają się najczęściej od chorych na gruźlicę płuc dorosłych członków rodziny. Im bliższy i dłuższy jest kontakt dziecka z chorym, tym większe jest ryzyko zakażenia prątkiem gruźlicy [11]. Najmłodsze dzieci z powodu niedoskonałych mechanizmów immunologicznych mają znacząco wyższe ryzyko rozwoju aktywnej gruźlicy w porównaniu z dorosłymi (30-40% w 1 roku życia vs. 5-10% >18 r. ż) [13].

WHO poza problemem prawidłowej diagnostyki gruźlicy u dzieci i dorosłych zwraca uwagę na problem diagnostyki utajonego zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* (latent tuberculosis infection, LTBI). Prawidłowa diagnostyka oraz leczenie LTBI są, zgodnie z raportem WHO z 2013 r., podstawą do uzyskania kontroli nad zapadalnością na gruźlicę na świecie [47].

Diagnostyka w kierunku zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) jest wskazana w następujących sytuacjach klinicznych:

- po kontakcie z chorym na gruźlicę płuc,
- przed planowanym leczeniem immunosupresyjnym (w tym przed przeszczepianiem narządów),
- przed włączeniem leczenia antagonistami czynnika martwicy nowotworów alfa (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ),
- u pacjentów zakażonych HIV,
- przy klinicznym podejrzeniu gruźlicy (np.: u dziecka z przewlekłym kaszlem, stanami podgorączkowymi, niedoborem masy ciała, nocnymi potami lub przy obecności przewlekających się zmian zapalnych w płucach, mimo stosowania prawidłowego leczenia) [2].

Przez ponad 100 lat jedynym badaniem służącym do rozpoznawania zakażenia prątkiem gruźlicy był odczyn tuberkulinowy (OT), nazywany też próbą tuberkulinową lub odczynem Mantoux. W pierwszych latach XXI w. pojawiły się nowe testy immunologiczne oceniające stężenie wydzielanego interferonu gamma nazywane testami IGRA.

## DIAGNOSTYKA TUBERKULINOWA

Pierwotnie stosowanej do dziś tuberkuliny przygotował Robert Koch w czasie eksperymentalnych prób stworzenia leku na gruźlicę. Przesącz z zabitych wysoką temperaturą hodowli prątków, wbrew wstępnym zapowiedziom naukowca i ku rozczarowaniu wielu chorych, nie sprawdził się jako skuteczny środek terapeutyczny [10,35,51].

Nazwę „tuberkulina” zaproponował polski naukowiec Odon Bujwid, który współpracował z Robertem Kochem i prowadził podobne badania w Polsce [24]. Podczas przeprowadzanych doświadczeń u zakażonych prątkami gruźlicy świnek morskich zaobserwowano miejscową reakcję skórą pojawiającą się po 48-72 godzinach od wstrzyknięcia tuberkuliny.

Tuberkulinę po raz pierwszy w diagnostyce zakażenia *M. tuberculosis* zastosował Clemens von Pirquet w 1907 r., a rok później Charles Mantoux wprowadził obowiązującą do dzisiaj metodę jej śródskórnego podawania. Tuberkulina otrzymana przez Roberta Kocho zawierała wiele zanieczyszczeń. W 1934 r. Florence Seibert metodą frakcjonowania uzyskała tzw. „oczyszczoną białkową pochodną” (pure protein derivative, PPD) historycznej tuberkuliny [10,35].

## Podłoże patofizjologiczne OT

Miejscowa reakcja zapalna powstająca po podaniu śródskórnym tuberkuliny jest przykładem nadwrażliwości typu późnego (IV typ reakcji wg Gella-Coombsa), czyli reakcji immunologicznej związanej z obecnością

uczulonych limfocytów. Objawia się obrzękiem i zgrubieniem skóry powstającym najwcześniej po 24 godzinach od iniekcji i jest dowodem na poprzedni kontakt pacjenta z antygenami prątków [18]. W miejscu podania tuberkuliny gromadzą się limfocyty T rozpoznające antygeny *M. tuberculosis*. Pod wpływem wydzielanych przez nie cytokin dochodzi do rozszerzenia naczyń, napływu kolejnych komórek zapalnych, co klinicznie objawia się naciekiem zapalnym i obrzękiem, stosownym do nasilenia odpowiedzi immunologicznej wobec antygenów prątków. Przy znacznej liczbie uczulonych limfocytów T wzmożony metabolizm komórek związany z nasiloną odpowiedzią immunologiczną może prowadzić do miejscowej hipoksji i kwasicy, co powoduje powstanie pęcherzyków, martwicy lub owrzodzenia [11,35]. Największe nasilenie reakcji występuje po 48-72 godzinach, następnie odczyn zapalny stopniowo słabnie [11].

## Technika wykonania OT

Tuberkulina jest podawana śródskórnym w przednią powierzchnię przedramienia, wynik podawany w milimetrach jest odczytywany po 72 godzinach i polega na pomiarze średnicy nacieku zapalnego w skórze w wymiarze poprzecznym do osi długiej przedramienia [11]. Zarówno śródskórna iniekcja tuberkuliny, jak i odczyt OT powinny być wykonywane przez doświadczony personel, gdyż błędy w wykonaniu mogą być przyczyną fałszywych wyników (tabela 1) [49].

## Czułość i swoistość testu

Tuberkulina jest mieszaniną zawierającą około 200 antygenów prątków *M. tuberculosis*, z których część jest wspólna dla prątków *M. bovis* BCG i prątków środowiskowych [13,25,26]. Jest to przyczyną obniżonej swoistości OT w populacjach szczepionych BCG, a więc i w Polsce, a także u osób eksponowanych na mikobakterie środowiskowe. Wskutek krzyżowej reakcji na tuberkulinę wyniki OT często są fałszywie dodatnie [11,15,27].

U dzieci ze względu na znacznie krótszy niż u dorosłych odstęp czasowy między szczepieniem BCG a wykonaniem OT znaczenie poszczepiennej alergii tuberkulinowej jest większe, co istotnie utrudnia prawidłową interpretację odczynu.

Inną przyczyną fałszywie dodatnich wyników jest tzw. efekt wzmocnienia („booster effect”), zjawisko do niedawna niedoceniane. Obserwuje się je przy testach powtarzanych w zbyt krótkim odstępie czasu. Najsilniejsze wzmocnienie występuje 48 godzin do 6 tygodni od wykonania testu wyjściowego, ale według niektórych autorów może się ono utrzymywać nawet do 2 lat [30]. Pierwsza iniekcja tuberkuliny indukuje aktywację i wzrost liczby uczulonych limfocytów, dlatego przy kolejnym teście reakcja skórna jest bardziej nasiloną niż wyjściowa. Działanie występuje zarówno u osób zakażonych, jak i szczepionych BCG niezakażonych prątkami gruźlicy [30,31,45].

Swoistość OT w diagnostyce zakażenia prątkiem gruźlicy u dzieci wynosi 90-92%, w diagnozowaniu aktywnej gruźlicy według różnych metaanaliz dotyczących populacji pediatrycznej waha się od 56 do 85% [28,41]. Wyższe wartości cechują ten test w populacjach nieszczepionych BCG [2,12].

Czułość OT w gruźlicy aktywnej potwierdzonej bakteriologicznie u dzieci według metaanalizy z 2014 r. wynosi 74-86% [37].

Brak lub niewielka reakcja skórna, mimo istnienia zakażenia, jest związana z czasowym bądź przewlekłym obniżeniem odporności i stwierdzana jest po niektórych ostrych infekcjach, szczepieniach innymi niż BCG żywymi szczepionkami, w przewlekłych chorobach oraz wskutek stosowanego leczenia immunosupresyjnego. Obserwowana jest również u najmłodszych dzieci i ludzi w wieku podeszłym [13,35].

Niezadowolającą czułość badania (65%) obserwuje się paradoksalnie u chorych na gruźlicę, co jest prawdopodobnie związane z obniżeniem odporności pod wpływem długo toczącej się choroby oraz powstaniem generacji komórek T regulatorowych (fenotyp Tr1) wydzielających IL-10, mającą właściwości immunosupresyjne [7]. Zjawisko to może wprowadzać w błąd, należy więc pamiętać, iż ujemne wyniki badania nie wykluczają aktywnej gruźlicy [36]. Przyczyny fałszywie ujemnych wyników przedstawiono w tabelach 1 i 2.

### Interpretacja OT

Kryteria interpretacji odczynu tuberkulinowego są bardzo niejednolite. Według wytycznych WHO dla Narodowych Programów Zwalczenia Gruźlicy dotyczących gruźlicy u dzieci z 2014 r. OT należy interpretować jako dodatni, gdy jest równy lub większy od 10 mm niezależnie od historii szczepienia BCG [48]. Natomiast u pacjentów zakażonych HIV lub ciężko niedożywionych każdy odczyn równy lub większy niż 5 mm powinien być uznany za pozytywny [48].

### W USA

Zgodnie z wytycznymi Amerykańskiej Akademii Pediatrii (AAP) odczyn interpretuje się w zależności od czynników ryzyka zakażenia prątkiem gruźlicy i ryzyka rozwoju choroby gruźliczej [1]:

U dzieci mających wysokie ryzyko zakażenia lub zachorowania na gruźlicę (pacjenci z immunosupresją, zakażeni HIV, po niedawnym bliskim kontakcie z chorym na gruźlicę) przyjmuje się niski próg odcięcia dodatnich wyników, to jest naciek  $\geq 5$  mm uznaje się za dodatni.

U dzieci < 4 roku życia lub chorych na choroby przewlekłe (nowotwory, cukrzyce, przewlekłą niewydolność nerek), a także u pacjentów niedożywionych odczyn  $\geq 10$  mm uznaje się za dodatni ze względu na podwyższone ryzyko zachorowania na gruźlicę.

U dzieci w wieku 4 lat i starszych bez dodatkowych czynników ryzyka wynik  $\geq 15$  mm jest wynikiem dodatnim.

Należy jednak pamiętać, że w Stanach Zjednoczonych nie stosuje się obligatoryjnie szczepień BCG [1].

### W EUROPIE

W European Respiratory Journal w 2010 r. opublikowano konsensus europejskich ekspertów dotyczący badań osób z kontaktu z chorymi na gruźlicę, w którym kryteria interpretacji odczynu tuberkulinowego uzależniono zarówno od ryzyka zakażenia i zachorowania, jak i od wieku, w jakim pacjent został zaszczepiony BCG (w pierwszym czy powyżej pierwszego roku życia). Wytyczne te powstały w oparciu o badania, które wykazały m. in., że alergia tuberkulinowa jest silniejsza i trwa znacząco dłużej, gdy szczepienie wykonano powyżej 1 roku życia [13]. Proponowane kryteria interpretacji dodatniego odczynu tuberkulinowego zamieszczono w tabeli 3.

### W POLSCE

W Polsce w II połowie XX wieku ftyzjopulmonolodzy dziecięcy interpretowali odczyn jako zakaźniowy, jeśli wielkość nacieku wynosiła więcej niż 15 mm i w każdym przypadku, gdy stwierdzono odczyn wysiękowy (pęcherzykowy). Jeśli średnica nacieku wyniosła 11-15 mm, interpretację uzależniano od odstępu od ostatniego szczepienia BCG. Jeżeli szczepienie BCG wykonano do 6 lat wstecz, odczyn interpretowano jak poszczepienny. W przypadku dłuższego niż 6 lat odstępu od szczepienia ten sam wynik interpretowano jako odczyn pozakaźny. Wynikało to z wieloletnich obserwacji i badań, które wskazywały, że tzw. „alergia poszczepienna” (czyli aktywność limfocytów T pamięci immunologicznej) może się utrzymywać do 6 lat [8,50].

**Tabela 1.** Przyczyny fałszywie ujemnych wyników OT związane z wykonywaniem testu [19,20,35]

| Przyczyny fałszywie ujemnych wyników OT zależne od przeprowadzenia testu |  |
|--|--|
| Związane z tuberkuliną   | Niewłaściwe przechowywanie, rozcierzenie, zanieczyszczenie, chemiczna denaturacja              |
| Związane z wykonaniem testu  | Za mała dawka, iniekcja podskórna, zbyt długi czas pomiędzy nabraniem do strzykawki a podaniem |
| Związane z odczytem testu  | Niedoświadczony personel, błąd pomiaru   |

**Tabela 2.** Przyczyny fałszywie ujemnych wyników OT związane z osobą badaną [13,20]

| Przyczyny fałszywie ujemnych wyników związane z osobą badaną |   |
|--|---|
| Wiek:  | < 6 miesiąca życia, > 65 roku życia   |
| Stan ogólny:   | niedożywienie, wyniszczenie   |
| Szczepienia wykonane do 6 tygodni przed OT:                  | przeciwno odrze, śwince, różyczce, ospie wietrznej, żółtej gorączce, doustnej przeciw polio i durowi brzuszemu  |
| Ostre infekcje:  | wirusowe (świnka, odra, różyczka, ospa wietrzna, mononukleozą zakaźną), bakteryjne (krztusiec, zakażenie <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , szkarlatyna, uogólnione zakażenia bakteryjne, ciężkie postaci gruźlicy), grzybicze (blastomikoza) |
| Choroby przewlekłe:  | sarkoidoza, niedoczynność tarczycy, przewlekła niewydolność nerek, choroby przebiegające z hipoproteinemią, źle wyrównana cukrzyca  |
| Choroby układu krwiotwórczego:                               | białaczki, chłoniaki  |
| Defekty immunologiczne:                                      | wrodzone i nabyte (w tym zakażenie HIV), jatrogenne w czasie steroidoterapii i stosowania innych leków immunosupresyjnych   |

**Tabela 3.** Rekomendowane przez europejski konsensus kryteria dodatniego wyniku OT w badaniu osób z kontaktu z chorym na gruźlicę [13]

| Próg odcięcia dodatniego wyniku OT  |   |   |  |
|---|---|---|--|
| Prawdopodobieństwo zakażenia  | Stan immunologiczny   | Brak szczepienia BCG lub szczepienie wykonane < 12 miesiąca życia | Szczepienie BCG powyżej 12 miesiąca życia    |
| <b>Wysokie</b> (bliski kontakt z chorym na gruźlicę z dodatnim rozmazem płwociny, spodziewane rozpowszechnienie zakażenia $\geq 10\%$ ) | Prawidłowa odporność  | $\geq 10$ mm  | $\geq 15$ mm                                 |
|   | Zaburzenia odporności:<br>Zakażenie HIV<br>Inne czynniki zwiększające ryzyko rozwoju gruźlicy | Ujemny OT nie wyklucza infekcji $\geq 5$ mm                       | Ujemny OT nie wyklucza infekcji $\geq 5$ mm  |
| <b>Niskie</b> (inne kontakty z chorym na gruźlicę, spodziewane rozpowszechnienie infekcji < 10%)  | Prawidłowa odporność  | $\geq 15$ mm  | OT niezalecany                               |
|   | Zaburzenia odporności:<br>Zakażenie HIV<br>Inne czynniki zwiększające ryzyko rozwoju gruźlicy | Ujemny OT nie wyklucza infekcji $\geq 10$ mm                      | Ujemny OT nie wyklucza infekcji $\geq 10$ mm |

Jak już wcześniej wspomniano, u dzieci większy jest wpływ niedawnego szczepienia BCG na wynik OT, w związku z czym interpretacja wyniku jest bardziej skomplikowana. Według zaleceń WHO dla Narodowych Programów Zwalczania Gruźlicy wydanych w 2001 r. przez Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc odczyn o wielkości 10–15 mm u dzieci jest częściej odczynem poszczepiennym, natomiast 16 mm i większy przemawia za infekcją *M. tuberculosis* [20].

Według aktualnych zaleceń Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc opublikowanych w 2013 r. w ogólnej populacji odczyn większy lub równy 10 mm uznaje się za dodatni [3]. Autorzy wytycznych zwracają jednak uwagę na ograniczoną przydatność testu u osób wielokrotnie szczepionych BCG. Natomiast w przypadku badania osób z kontaktu z chorymi na gruźlicę płuc eksperci zalecają interpretację OT według kryteriów wspomnianego wcześniej europejskiego konsensusu.

W Polsce ze względu na powszechne szczepienia BCG, do 2005 r. włącznie wykonywane dwukrotnie, prawidłowa

interpretacja odczynu tuberkulinowego jest wyjątkowo trudna, a rozbieżności między zaleceniami różnych grup ekspertów nie ułatwiają tego zadania.

### TESTY UWALNIANIA INTERFERONU GAMMA

W 2001 r. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) zaaprobowała do diagnozowania zakażenia *M. tuberculosis* nowy test immunologiczny polegający na pomiarze stężenia interferonu gamma pod nazwą Quantiferon, a w 2007 r. jego nowszą wersję – QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (QFT-GIT) [29].

Pierwotny obecnych testów powstał w celu diagnozowania gruźlicy u bydła i opierał się na pomiarze stężenia interferonu gamma wydzielanego przez limfocyty T po inkubacji krwi z tuberkuliną. Próbowano ten sam test zastosować u ludzi w diagnostyce latentnego zakażenia *M. tuberculosis*, jednak okazał się mniej swoisty od próby tuberkulinowej [29,39].

W 1990 r. wyizolowano swoiste dla prątka gruźlicy peptydy, kodowane w regionie RD-1 (region of difference 1), nieobecnym w genomie szczepów szczepionkowych oraz większości prątków środowiskowych z wyjątkiem *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*. Badania dwóch białek kodowanych przez ten region: wczesno wydzielniczego białka o masie cząsteczkowej 6 kDa (Early Secretory Antigenic Target, ESAT-6) i białka przesączu hodowlanego o masie cząsteczkowej 10 kDa (Culture Filtrate Protein, CFP-10) wykazały, że są bardzo silnymi stymulantami odpowiedzi komórkowej, a zwłaszcza wydzielania interferonu  $\gamma$  we wczesnym okresie infekcji gruźliczej [6,26]. Po zamianie tuberkuliny na wyżej wymienione rekombinowane białka prątka uzyskano wysoce swoiste testy do wykrywania zakażenia latentnego [29]. Wkrótce dodano jeszcze jeden antygen Tb7.7 z regionu RD-11 i zmodyfikowano test, opłaszczając ścianki probówek antygenami [29].

### Podłoże immunologiczne

Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) jest główną cytokiną wydzielaną w procesie obrony organizmu przed inwazją prątka gruźlicy. We krwi osób zakażonych są obecne limfocyty pamięci swoiste antygenami prątków. Komórki te po ponownym zetknięciu się z danym antygenem i rozpoznaniu go zaczynają intensywnie wydzielać IFN- $\gamma$  [14,32].

Testy IGRA polegają na pomiarze stężenia wydzielanego IFN- $\gamma$  lub pomiarze liczby komórek wydzielających interferon po inkubacji pełnej krwi pacjenta z wyizolowanymi swoistymi antygenami prątków. Zwiększona synteza interferonu potwierdza obecność w pobranej próbce krwi pacjenta komórek pamięci rozpoznających antygeny prątka, czyli potwierdza zakażenie [32,43].

Zasadniczą przewagą IGRA w porównaniu z próbą tuberkulinową jest ich znacząco lepsza swoistość oraz brak wpływu szczepienia BCG na wynik badania, co ma szczególne znaczenie dla populacji szczepionych, do których należy Polska [36,39,43].

### QuantiFERON-TB Gold in-Tube i T-SPOT.TB

Obecnie są dostępne 2 typy testów komercyjnych, opartych na różnych technikach oceny wytwarzania IFN- $\gamma$  przez limfocyty pacjentów: ELISA i ELI-Spot. Pierwszy z nich to QuantiFERON-TB Gold in-Tube (QFT-GIT) australijskiej firmy Cellestis, drugi: T-SPOT<sup>®</sup>.TB brytyjskiej firmy Oxford Immunotec Ltd [33,42,43].

W teście QFT-GIT metodą ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) mierzone jest stężenie IFN- $\gamma$  wydzielanego przez limfocyty T po inkubacji próbki krwi pacjenta w probówce opłaszczanej rekombinowanymi antygenami prątków [33]. Zestaw do wykonania testu zawiera 3 probówki, w tym jedną zawierającą mieszaninę 14 peptydów odpowiadających sekwencjom wyizolowanych swoistych białek („TB antygen”), jedną

z kontrolą dodatnią („Mitogen”) i jedną zawierającą kontrolę ujemną („Nil”) [33] (ryc.1).

T-SPOT.TB jest wykonywany metodą ELISpot, która łączy krótkotrwałą hodowlę komórkową limfocytów T i technikę immunoenzymatyczną. W teście tym jest oceniana liczba limfocytów T pobudzonych pod wpływem inkubacji z antygenami prątka i wydzielających IFN- $\gamma$ . Pobudzone komórki T po połączeniu z barwnym wskaźnikiem tworzą niebieskie plamy (spots) widoczne na membranie [42] (ryc. 2).

T-SPOT.TB podobnie jak QFT-GIT zawiera kontrolę dodatnią i ujemną. Wyniki interpretuje się według ściśle wytycznych producenta (tabela 4 i 5).

### Czułość i swoistość testów

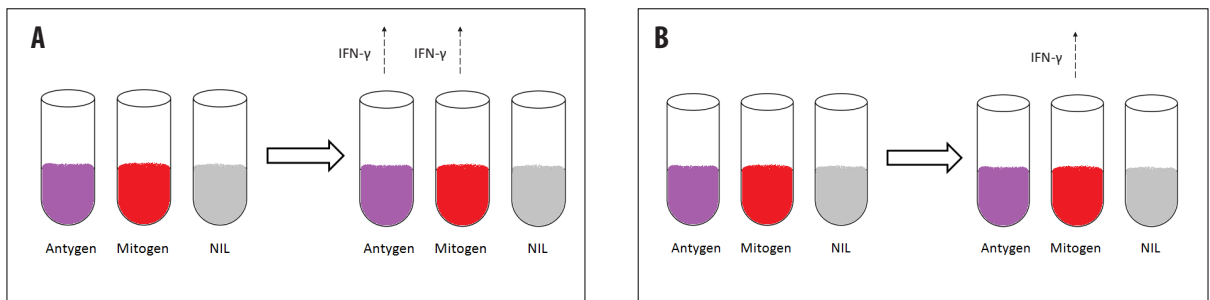
W wielu metaanalizach opublikowanych w latach 2010-2012 dotyczących stosowania IGRA w diagnostyce zakażenia *M. tuberculosis* u dzieci stwierdzono, podobnie jak w przypadku dorosłych, znacząco lepszą swoistość IGRA w porównaniu z OT (88% - QFT-GIT, 90% - T-SPOT.TB, 65% - OT) [9,12,41].

W nowszej metaanalizie z 2014 r. [37] oceniającej przydatność testów w diagnozowaniu gruźlicy u dzieci stwierdzono porównywalną, wysoką czułość testów QFT-GIT i OT w krajach o wysokich dochodach (odpowiednio 79 i 78%), znacząco niższą czułość w krajach biednych (odpowiednio: 57 i 67%). Warto w tym miejscu zaznaczyć, że w krajach rozwijających się na obniżoną czułość IGRA znaczący wpływ mają: niedożywienie oraz przewlekłe zakażenia (malaria, infekcje pasożytnicze) [5,44].

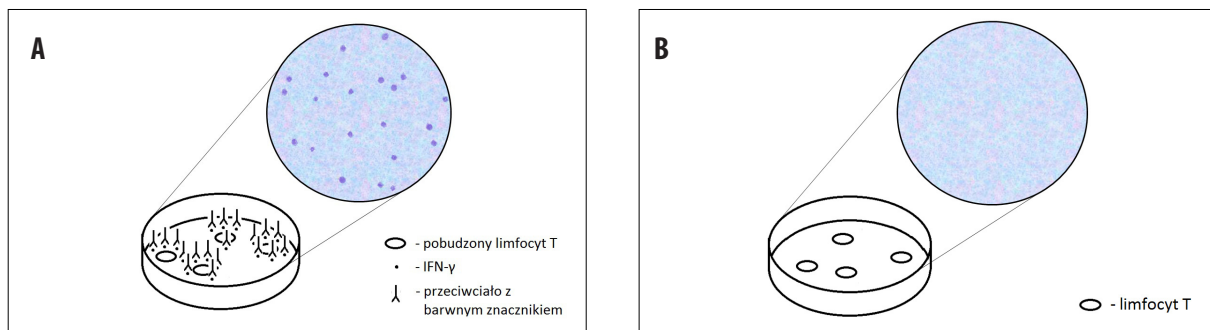
Swoistość testów w tych krajach była porównywalna, natomiast w krajach wysoko rozwiniętych swoistość IGRA była znacząco wyższa w porównaniu z OT (97% - QFT-GIT, 98% - T-SPOT.TB, 92% - OT) [37].

### Rekomendacje stosowania IGRA

Oba testy IGRA zostały pozytywnie zaopiniowane przez amerykańską FDA do diagnostyki zakażenia *M. tuberculosis* w latach 2007-2008. W 2010 r. CDC (Centers for Disease Control and Prevention – Centrum Kontroli i Prewencji Chorób) sformułowało rekomendacje dopuszczające wykonywanie testów IGRA u dorosłych we wszystkich sytuacjach, w których do tej pory wykonywano próbę tuberkulinową [29]. Początkowo bardzo ostrożnie podchodzono do możliwości zastosowania tych testów u dzieci, zwłaszcza najmłodszych. W wyżej cytowanych rekomendacjach podkreśla się, że u dzieci poniżej 5 roku życia zalecanym testem do diagnozowania zakażenia prątkiem gruźlicy jest odczyn tuberkulinowy. Ograniczenie stosowania testów u najmłodszych pacjentów wynikało z obaw dotyczących niepełnej dojrzałości mechanizmów immunologicznych, a zwłaszcza odpowiedzi typu komórkowego. Obserwowano słabszą



**Ryc. 1.** Test QFT-GIT: A - wynik dodatni: IFN- $\gamma$  pojawia się w próbkach z antygenami prątka gruźlicy i w kontroli dodatniej; B - wynik ujemny: IFN- $\gamma$  pojawia się wyłącznie w próbce z kontrolą dodatnią



**Ryc. 2.** Test T-SPOT.TB: A - wynik dodatni: pobudzone po kontakcie z antygenami prątka limfocyty T wydzielają IFN- $\gamma$ . Znakowane barwnikiem przeciwciała łączą się z cytokiną, co w efekcie daje obraz barwnych plam, z których każda odpowiada jednemu pobudzonemu limfocytowi T; B - wynik ujemny: u osób niezakażonych prątkiem gruźlicy limfocyty T nie ulegają pobudzeniu po inkubacji z antygenami prątków gruźlicy i nie wydzielają IFN- $\gamma$

**Tabela 4.** Interpretacja wyników QFT-GIT [33]

| Stężenie IFN- $\gamma$ (IU/ml) w próbce „Nil” | Różnica stężeń IFN- $\gamma$ (IU/ml) między próbką „Tb-antygen” i „Nil” | Różnica stężeń IFN- $\gamma$ (IU/ml) między próbką „Mitogen” i „Nil” | Wynik QFT-GIT |
|---|---|--|---------------|
| $\leq 8,0$                                    | $< 0,35$  | $\geq 0,5$   | Ujemny        |
| $\leq 8,0$                                    | $\geq 0,35$ i $< 25\%$ „Nil”  | $\geq 0,5$   | Ujemny        |
| $\leq 8,0$                                    | $\geq 0,35$ i $\geq 25\%$ „Nil”   | Nieistotna   | Dodatni       |
| $\leq 8,0$                                    | $< 0,35$  | $< 0,5$  | Nieokreślony  |
| $\leq 8,0$                                    | $\geq 0,35$ i $< 25\%$ „Nil”  | $< 0,5$  | Nieokreślony  |
| 8,0   | Nieistotna  | Nieistotna   | Nieokreślony  |

**Tabela 5.** Interpretacja wyników T-SPOT.TB [42]

| Panel A minus NIL (różnica barwnych plam pomiędzy płytką z antygenem ESAT-6 i płytką z kontrolą ujemną) | Panel B minus NIL (różnica barwnych plam pomiędzy płytką z antygenem CFP-10 i płytką z kontrolą ujemną) | Mitogen<br>Liczba barwnych plam na płytce z kontrolą dodatnią* | Interpretacja wyniku         |
|---|---|--|------------------------------|
| $\geq 8$  | Bez znaczenia   | $\geq 20$  | Dodatni                      |
| Bez znaczenia   | $\geq 8$  | $\geq 20$  | Dodatni                      |
| 5-7   | $\leq 4$  | $\geq 20$  | Graniczny (należy powtórzyć) |
| $\leq 4$  | 5-7   | $\geq 20$  | Graniczny (należy powtórzyć) |
| $\leq 4$  | $\leq 4$  | $\geq 20$  | Ujemny                       |

\*W razie uzyskania  $< 20$  barwnych plam na płytce z kontrolą dodatnią interpretacja wyniku powinna być przeprowadzona zgodnie ze szczegółowymi wytycznymi producenta zawartymi w instrukcji przeprowadzenia testu [42]

odpowiedź (niższe stężenie IFN- $\gamma$ ) po stymulacji mitogenem u dzieci poniżej 5 roku życia [13,21,29].

Zalecenia ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control – Europejskie Centrum Kontroli i Prewencji Chorób) z 2011 r. dopuszczają możliwość stosowania IGRA u dzieci w diagnozowaniu zakażenia prątkiem gruźlicy oraz jako badania wspierającego diagnozę gruźlicy aktywnej [14]. Podkreśla się jednak konieczność zachowania bardzo dużej ostrożności w interpretacji ujemnych wyników testów zwłaszcza u dzieci poniżej 5 roku życia.

W 2012 r. opublikowano rekomendacje Amerykańskiej Akademii Pediatrii (American Academy of Pediatrics, AAP) wskazujące na IGRA jako badanie preferowane u dzieci powyżej 5 roku życia szczepionych BCG. Ponadto zaaprobowano wykonywanie IGRA również u dzieci poniżej 5 roku życia, choć zalecany w tej grupie wiekowej jest OT [1].

W tabeli 6. podano szczegółowe zalecenia AAP dotyczące wskazań do zastosowania OT i IGRA w poszczególnych sytuacjach klinicznych.

Według wspomnianego wcześniej europejskiego konsensusu dotyczącego badania osób z kontaktu z chorym na gruźlicę testy IGRA są preferowane w diagnostyce utajonego zakażenia prątkiem gruźlicy u osób dorosłych i dzieci szczepionych BCG (bez ograniczeń wieku). Są również zalecane do weryfikacji dodatnich wyników odczynów tuberkulinowych. U osób dorosłych uzyskanie ujemnego wyniku IGRA, mimo dodatniego OT, jest interpretowane jako brak zakażenia. Jednak u najmłodszych dzieci przy rozbieżnych wynikach badań zaleca się ostrożność w ostatecznej ocenie wyników testów [13].

Według wytycznych Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc z 2013 r. w diagnostyce utajonego zakażenia prątkiem gruźlicy u immunokompetentnych osób dorosłych oraz dzieci powyżej 5 roku życia zaleca się stosowanie IGRA. U małych dzieci warto wykonywać obydwa badania: OT i IGRA, pamiętając o tym, aby krew na badanie IGRA

pobrać nie później niż w dniu odczytu OT. Udokumentowano, że swoistość IGRA u dzieci jest duża niezależnie od wieku, więc dodatni wynik wskazuje z dużym prawdopodobieństwem na zakażenie *Mycobacterium tuberculosis*. Ze względu na wyższy odsetek wyników nieokreślonych wśród dzieci poniżej 5 roku życia przydatność IGRA w tej grupie jest nieco mniejsza [3].

Łączne stosowanie IGRA i OT zaleca się również w diagnozowaniu zakażenia prątkiem gruźlicy u dzieci przed planowanym włączeniem leczenia antagonistami czynnika martwicy nowotworów [38].

## NOWE MARKERY ZAKAŻENIA

Ze względu na niedoskonałość istniejących metod wykrywania zakażenia prątkiem gruźlicy nadal trwają poszukiwania nowych markerów zakażenia. Wśród badanych cząsteczek znalazły się między innymi MCP (białko chemotaktyczne dla monocytów, monocyte chemotactic protein), MIG (monokina indukowana interferonem gamma, monokine induced by interferon gamma), interleukiny: IL-2, -4, -6, -8, TNF- $\alpha$  [16,17,22,46]. Dotychczas najbardziej obiecujące wyniki dały badania nad białkiem o masie cząsteczkowej 10 kD indukowanym przez interferon gamma (interferon-gamma-inducible protein of 10 kDa, IP-10,) [17,40]. Jednak wykorzystanie nowych markerów pozostaje nadal w sferze badań, dlatego ich dokładniejsze omówienie wykracza poza ramy niniejszego artykułu.

## PODSUMOWANIE

Reasumując: W warunkach polskich ze względu na powszechne szczepienie BCG, u starszej młodzieży nawet dwukrotne, testy IGRA wydają się atrakcyjną alternatywą w diagnostyce zakażenia prątkiem gruźlicy z powodu wyższej w porównaniu z OT swoistości, dokładnych kryteriów interpretacji oraz braku wpływu szczepienia BCG na wynik badania. Pewną wadę stanowi koszt badania oraz możliwość wykonania tych testów w nielicznych laboratoriach.

**Tabela 6.** Rekomendacje AAP dotyczące stosowania OT i IGRA u dzieci [1]

| Rekomendacje AAP dotyczące stosowania OT i IGRA u dzieci |   |
|--|---|
| OT preferowany, IGRA dopuszczalny                        | Dzieci <5 roku życia <sup>1</sup>   |
| IGRA preferowany, OT dopuszczalny                        | Dzieci $\geq$ 5 roku życia szczepione BCG<br>Dzieci $\geq$ 5 roku życia, które mogą się nie zgłosić na odczyt OT  |
| OT i IGRA należy rozważyć gdy                            | Wyjściowy i powtórzony IGRA jest nieokreślony<br>Wyjściowy test (którykolwiek) jest ujemny przy jednoczesnym poważnym klinicznym podejrzeniu gruźlicy lub obecne jest wysokie ryzyko progresji choroby gruźliczej i złego rokowania <sup>2</sup><br>Wyjściowy OT jest dodatni i:<br>dziecko ma powyżej 5 lat i było szczepione BCG<br>wskazane są dodatkowe badania, by poprawić współpracę z pacjentem w zakresie leczenia<br>podejrzewana jest mikobakterioza |

<sup>1</sup> Znaczący jest dodatni wynik któregośkolwiek testu;

<sup>2</sup> Nie należy stosować IGRA u dzieci poniżej 2 r. z. z wyjątkiem podejrzenia gruźlicy aktywnej. Istnieją ograniczone dane dotyczące przydatności IGRA w rozpoznawaniu zakażenia prątkiem u dzieci od 2 do 4 roku życia, ale w przypadku podejrzenia choroby gruźliczej można je wykonywać.



**Tabela 7.** Porównanie OT i IGRA

| Metoda   | OT   | IGRA  |
|--|--|---|
|  | Śródkórna iniekcja tuberkuliny i pomiar średnicy naciek w skórze po 72 godz. (2 wizyty pacjenta) | Pobranie krwi, inkubacja próbek, test ELISA/ELISpot w laboratorium (1 wizyta pacjenta)      |
| Czułość badania<br>(Wg systematycznych przeglądów i metaanaliz [9,12,32,41]) | 70-86%   | 62-90%  |
| Swoistość<br>(Wg systematycznych przeglądów i metaanaliz [20,41])            | 56-90%   | 82-100%   |
| Koszt badania  | Niski  | Wysoki  |
| Wymogi techniczne i personalne   | Doświadczony personel, Tuberkulina   | Zestaw próbek testowych<br>Transport do specjalistycznego laboratorium wykonującego badanie |

W przypadku najmłodszych dzieci wskazane jest równoczesne wykonywanie obu badań i ostrożna interpretacja wyników w kontekście potencjalnego ryzyka zakażenia i zachorowania na gruźlicę.

W tabeli 7. zestawiono porównanie OT i IGRA pod względem metod wykonywania, kosztów, warunków niezbędnych do przeprowadzenia badań oraz wiarygodności obu testów.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] American Academy of Pediatrics: Tuberculosis. W: Report of the Committee on Infectious Disease. Red Book 2012. 2012, 736-759
- [2] American Thoracic Society (ATS) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. Official statement of the American Thoracic Society. Am. J. Respir. Crit Care Med., 2000; 161: S221-S247
- [3] Augustynowicz-Kopec E., Demkow U., Grzelewska-Rzymowska I., Korzeniewska-Koseła M., Langfort R., Michałowska-Mitczuk D., Rowińska-Zakrzewska E., Zielonka T.M., Ziolkowski J., Zwolska Z.: Zalecenia Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc dotyczące rozpoznawania, leczenia i zapobiegania gruźlicy u dorosłych i dzieci. Pneumonol. Alergol. Pol., 2013; 81: 323-379
- [4] Augustynowicz-Kopec E., Zwolska Z.: Epidemiologia gruźlicy u dzieci i niektóre problemy diagnostyki mikrobiologicznej. Post. Nauk Med., 2008; 9: 569-577
- [5] Banfield S., Pascoe E., Thambiran A., Siafarikas A., Burgner D.: Factors associated with the performance of a blood-based interferon-gamma release assay in diagnosing tuberculosis. PLoS One, 2012; 7: e38556
- [6] Borkowska D., Zwolska Z., Michałowska-Mitczuk D., Korzeniewska-Koseła M., Zabost A., Napiórkowska A., Kozłowska M., Brzezińska S., Augustynowicz-Kopec E.: Interferonowy test T-SPOT.TB w diagnostyce latentnego zakażenia prątkiem gruźlicy. Pneumonol. Alergol. Pol., 2011; 79: 264-271
- [7] Boussiotis V.A., Tsai E.Y., Yunis E.J., Thim S., Delgado J.C., Dascher C.C., Berezovskaya A., Rousset D., Reynes J.M., Goldfeld A.E.: IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. J. Clin. Invest., 2000; 105: 1317-1325
- [8] Ceglecka-Tomaszewska K.: Gruźlica u dzieci. PZWL, Warszawa 1996
- [9] Chiappini E., Accetta G., Bonsignori F., Boddi V., Galli L., Biggeri A., de Martino M.: Interferon-gamma release assays for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in children: a systematic review and meta-analysis. Int. J. Immunopathol. Pharmacol., 2012; 25: 557-564
- [10] Daniel T.M.: The history of tuberculosis. Respir. Med., 2006; 100: 1862-1870
- [11] Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2000; 161: 1376-1395
- [12] Diel R., Loddenkemper R., Nienhaus A.: Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. Chest, 2010; 137: 952-968
- [13] Erkens C.G., Kamphorst M., Abubakar I., Bothamley G.H., Chemtob D., Haas W., Migliori G.B., Rieder H.L., Zellweger J.P., Lange C.: Tuberculosis contact investigation in low prevalence countries: a European consensus. Eur. Respir. J., 2010; 36: 925-949
- [14] European Centre for Disease Prevention and Control: Use of interferon-gamma release assays in support of TB diagnosis. ECDC; Stockholm 2011
- [15] Farhat M., Greenaway C., Pai M., Menzies D.: False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? Int. J. Tuberc. Lung Dis., 2006; 10: 1192-1204
- [16] Frahm M., Goswami N.D., Owzar K., Hecker E., Mosher A., Cadoogan E., Nahid P., Ferrari G., Stout J.E.: Discriminating between latent and active tuberculosis with multiple biomarker responses. Tuberculosis, 2011; 91: 250-256
- [17] Goletti D., Raja A., Syed Ahamed K.B., Rodrigues C., Sodha A., Carrara S., Vernet G., Longuet C., Ippolito G., Thangaraj S., Lepoortier M., Girardi E., Lagrange P.H.: Is IP-10 an accurate marker for detecting *M. tuberculosis*-specific response in HIV-infected persons? PLoS One, 2010; 5: e12577
- [18] Gołęb J., Jakóbsiak M.: Odpowiedzi komórkowe. W: Immunologia, red. J. Gołęb, M. Jakóbsiak, W. Lasek, T. Stokłosa. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2010, 78-93
- [19] Huebner R.E., Schein M.F., Bass J.B.Jr.: The tuberculin skin test. Clin. Infect. Dis., 1993; 17: 968-975

- [20] Jakubowiak W., Korzeniewska-Kosela M., Kus J.: Podręcznik gruźlicy - Zalecenia Narodowego Programu Zwalczenia Gruźlicy, 2001
- [21] Kampmann B., Tena-Coki G., Anderson S.: Blood tests for diagnosis of tuberculosis. *Lancet*, 2006; 368: 282-283
- [22] Kellar K.L., Gehrke J., Weis S.E., Mahmutovic-Mayhew A., Davila B., Zajdowicz M.J., Scarborough R., LoBue P.A., Lardizabal A.A., Daley C.L., Reves R.R., Bernardo J., Campbell B.H., Whitworth W.C., Mazurek G.H.: Multiple cytokines are released when blood from patients with tuberculosis is stimulated with *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *PLoS One*, 2011; 6: e26545
- [23] Korzeniewska-Kosela M.: Gruźlica i Choroby Układu Oddechowego w Polsce w 2014 roku. Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa 2015
- [24] Kucharz E.J.: Historia medycyny. Wkład Krakowa w rozwój światowej medycyny. *Reumatologia*, 2012; 50: 276-293
- [25] Lalvani A., Connell D.W.: Tuberculosis immunodiagnosis: delving below the surface. *Thorax*, 2013; 68: 204-206
- [26] Lalvani A., Richeldi L., Kunst H.: Interferon gamma assays for tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.*, 2005; 5: 322-324
- [27] Mack U., Migliori G.B., Sester M., Rieder H.L., Ehlers S., Goletti D., Bossink A., Magdorf K., Hölscher C., Kampmann B., Arend S.M., Detjen A., Bothamley G., Zellweger J.P., Milburn H. i wsp.: LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *M. tuberculosis*? A TBNET consensus statement. *Eur. Respir. J.*, 2009; 33: 956-973
- [28] Mandalakas A.M., Detjen A.K., Hesselting A.C., Benedetti A., Menzies D.: Interferon-gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2011; 15: 1018-1032
- [29] Mazurek G.H., Jereb J., Vernon A., LoBue P., Goldberg S., Castro K., IGRA Expert Committee, Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection - United States, 2010. *MMWR Recomm. Rep.*, 2010; 59 (RR-5): 1-25
- [30] Menzies D.: Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999; 159: 15-21
- [31] Menzies R., Vissandjee B., Rocher I., St. Germain Y.: The booster effect in two-step tuberculin testing among young adults in Montreal. *Ann. Intern. Med.*, 1994; 120: 190-198
- [32] Pai M., Zwerling A., Menzies D.: Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann. Intern. Med.*, 2008; 149: 177-184
- [33] QuantiFERON® - TB Gold. (In - Tube Method) Package Insert. [www.cellestis.com](http://www.cellestis.com) (30.04.2014)
- [34] Rigouts L.: Clinical practice: diagnosis of childhood tuberculosis. *Eur. J. Pediatr.*, 2009; 168: 1285-1290
- [35] Schaaf H.S., Zumla A.: Tuberculosis: a comprehensive clinical reference. Elsevier Health Sciences 2009
- [36] Sester M., Sotgiu G., Lange C., Giehl C., Girardi E., Migliori G.B., Bossink A., Dheda K., Diel R., Dominguez J., Lipman M., Nemeth J., Ravn P., Winkler S., Huitric E., Sandgren A., Manissero D.: Interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur. Respir. J.*, 2011; 37: 100-111
- [37] Sollai S., Galli L., de Martino M., Chiappini E.: Systematic review and meta-analysis on the utility of Interferon-gamma release assays for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children: a 2013 update. *BMC Infect. Dis.*, 2014; 14 (Suppl. 1): S6
- [38] Solovic I., Sester M., Gomez-Reino J.J., Rieder H.L., Ehlers S., Milburn H.J., Kampmann B., Hellmich B., Groves R., Schreiber S., Wallis R.S., Sotgiu G., Schölvinck E.H., Goletti D., Zellweger J.P. i wsp.: The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement. *Eur. Respir. J.*, 2010; 36: 1185-1206
- [39] Starke J.R.: Interferon-gamma release assays for diagnosis of tuberculosis infection in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 2006; 25: 941-942
- [40] Strzelak A., Komorowska-Piotrowska A., Ziolkowski J.: CXCL10/IP-10 as a new biomarker for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Pol. Merkur. Lekarski*, 2012; 33: 342-345
- [41] Sun L., Xiao J., Miao Q., Feng W.X., Wu X.R., Yin Q.Q., Jiao W.W., Shen C., Liu F., Shen D., Shen A.D.: Interferon gamma release assay in diagnosis of pediatric tuberculosis: a meta-analysis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2011; 63: 165-173
- [42] T-SPOT.TB. (Package Insert). [www.tspot.com](http://www.tspot.com) (30.04.2014)
- [43] Thillai M., Pollock K., Pareek M., Lalvani A.: Interferon-gamma release assays for tuberculosis: current and future applications. *Expert Rev. Respir. Med.*, 2014; 8: 67-78
- [44] Thomas T.A., Mondal D., Noor Z., Liu L., Alam M., Haque R., Banu S., Sun H., Peterson K.M.: Malnutrition and helminth infection affect performance of an interferon-g-release assay. *Pediatrics*, 2010; 126: e1522-e1529
- [45] Thompson N.J., Glassroth J.L., Snider D.E.Jr., Farer L.S.: The booster phenomenon in serial tuberculin testing. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1979; 119: 587-597
- [46] Whittaker E., Gordon A., Kampmann B.: Is IP-10 a better biomarker for active and latent tuberculosis in children than IFN $\gamma$ ? *PLoS One*, 2008; 3: e3901
- [47] World Health Organization. WHO Global Tuberculosis Report 2013
- [48] World Health Organization. Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children-2nd ed. WHO: Geneva 2014
- [49] Zielonka T.M.: Rola odczynu tuberkulinowego w diagnostyce gruźlicy. *Med. Dypl.*, 2006; 15: 20-30
- [50] Ziolkowski J.: Gruźlica pierwotna. W: Choroby układu oddechowego. PZWL, Warszawa 2000, 249-269
- [51] Zwolska Z.: Praca Roberta Kocha nad rozwojem bakteriologii chorób zakaźnych. Walka z gruźlicą u ludzi i zwierząt w Polsce. Stulecie pierwszego polskiego laboratorium prątków Rudka 1912-2012. Kawdruk: Warszawa 2012

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.