

Iwona Kozłowska¹, Małgorzata Filewska¹, Adriana Roży¹, Ewa Augustynowicz-Kopeć²,
Dorota Krawiecka³, Beata Broniarek-Samson¹, Urszula Demkow^{1, 4}

¹Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Kierownik: mgr Beata Broniarek-Samson

²Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. med. Zofia Zwolska

³Zakład Diagnostyki Mikrobiologicznej, Kujawsko-Pomorskie Centrum Pulmonologii w Bydgoszczy

Kierownik: mgr Dorota Krawiecka

⁴Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego Akademii Medycznej w Warszawie

Kierownik: prof. dr hab. Maria Wąsik

Ocena odpowiedzi humoralnej przeciwko antygenom prątka w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych u chorych na gruźlicę płuc potwierdzoną bakteriologicznie i metodami genetycznymi

Evaluation of humoral immune response against mycobacterial antigens in bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary tuberculosis confirmed by genetic and culture methods

Abstract

Introduction: The resistance to TB is cells-mediated but humoral response is common and may be correlated with the lack of effective local cellular defence mechanisms. The goal of the study was to evaluate IgG, IgA and IgM mediated humoral immune response against 38kDa plus 16kDa and 38kDa plus lipoarabinomannan (LAM) mycobacterial antigens in BALF from patients with culture confirmed and PCR positive pulmonary tuberculosis (TB) compared to non-tuberculous controls (NTB).

Material and methods: 79 BALF samples (46 TB and 30 NTB) were examined. In 25 BALF samples from TB patients nucleic acids from *M. tuberculosis* were detected by PCR method. Commercially available ELISA — based assays against proteins 38kDa and 16kDa or 38kDa plus LAM were used. Three different dilutions of BALF: 1 : 1 and 1 : 10 were tested. Mean IgG level against 38 + LAM was significantly higher in TB group compared to control ($p < 0,0001$). No difference was observed between TB and NTB group in titer of IgM antibodies.

Results: Sensitivity of the tests based on IgG anti38kDa + 16kDa was 49%, IgG anti38kDa + LAM — 33%, IgA anti38kDa + LAM — 100%, IgM anti38kDa + LAM — 35%. Specificity of examined assays: IgA anti38kDa + LAM — 13%, IgM anti38kDa + LAM — 75%, IgG anti38kDa + 16kDa — 87%, IgG anti38kDa + LAM — 93%. The findings of the study indicate that TB is associated with the presence of detectable levels of antibodies in the BALF.

Conclusions: Examined tests detecting IgG in BALF can be used in combination with other diagnostic methods to increase diagnostic accuracy of pulmonary TB.

Key words: tuberculosis, diagnosis, antimycobacterial antibodies, BAL

Pneumonol. Alergol. Pol. 2007; 75: 355–362

Streszczenie

Wstęp: Celem pracy była ocena stężenia przeciwciał przeciwko antygenom prątka gruźlicy w płynie uzyskanym podczas płukania oskrzelowo-pęcherzykowego u chorych na gruźlicę płuc potwierdzoną bakteriologicznie oraz porównanie przydatności metod serologicznych i metod genetycznych (łańcuchowa reakcja polimerazy) w rozpoznawaniu gruźlicy u tych chorych.

Adres do korespondencji: Iwona Kozłowska, ul. Kabacki Dukt 14/51, 02–798 Warszawa, tel.: 606 384 608; (022) 431 21 95, e-mail: ivkz@wp.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 10.04.2007 r.

Copyright © 2007 Via Medica

ISSN 0867–7077

Materiał i metody: Odpowiedź humoralną na antygeny prątka oceniono za pomocą testu immunoenzymatycznego, porównując stężenia przeciwciał różnych klas przeciwko rekombinowanym antygenom prątka 38kDa, 16kDa i LAM w materiale pochodzącym z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego. Grupę badaną stanowili chorzy na gruźlicę płuc zdiagnozowaną przy użyciu metody BACTEC, a grupę kontrolną chorzy na inne choroby układu oddechowego. Przeprowadzono analizę czułości i swoistości zastosowanych testów.

Wyniki: Czułość dla testu IgG anty38kDa + 16kDa wynosiła 49%, IgG anty38kDa + LAM — 33%, IgA anty38kDa + LAM — 100%, IgM anty38kDa + LAM — 35%. Swoistość użytych testów wyniosła dla antygeny IgA anty38kDa + LAM — 13%, IgM anty38kDa + LAM — 75%, IgG anty38kDa + 16kDa — 87%, IgG anty38kDa + LAM — 93%.

Wnioski: Badane testy, oparte na przeciwciałach klasy IgG, mogą być przydatne, łącznie z innymi metodami diagnostycznymi, w rozpoznawaniu gruźlicy.

Słowa kluczowe: gruźlica, diagnostyka, przeciwciała przeciwprątkowe, BAL

Pneumonol. Alergol. Pol. 2007; 75: 355–362

Wstęp

Diagnostyka gruźlicy opiera się na wywiadach, objawach klinicznych, badaniach radiologicznych i badaniach mikrobiologicznych [1, 2]. Dodatni wynik posiewu pozwala na definitywne rozpoznanie gruźlicy. Najczęściej badanym materiałem jest płwocina lub wydzielina pobrana podczas bronchofiberoskopii, to jest bronchoaspirat lub płyn uzyskany w wyniku płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF, *bronchoalveolar lavage fluid*) [1, 2]. Pomocne są także metody wykrywania prątków metodami genetycznymi.

W przebiegu zakażenia prątkiem gruźlicy obserwuje się swoiste pobudzenie układu immunologicznego zarówno pod postacią odpowiedzi komórkowej, jak i humoralnej [3]. Odpowiedź humoralna na antygeny prątka nie ma istotnego znaczenia obronnego, ponieważ prątki zamknięte w tkankach martwiczych i makrofagach są niedostępne dla przeciwciał [3]. Z drugiej jednak strony cechy swoistej aktywacji układu immunologicznego, objawiające się pojawieniem się przeciwciał przeciw *Mycobacterium tuberculosis* w materiale pochodzącym od pacjentów, można traktować jako markery obecności zakażenia prątkiem [4, 5].

W surowicy chorych na gruźlicę stężenie przeciwciał przeciwko antygenom *Mycobacterium tuberculosis* może być niskie. W tej sytuacji celowe wydaje się poszukiwanie przeciwciał w płynach ustrojowych pochodzących z narządu zajętego przez proces gruźliczy [6, 7].

Celem pracy była ocena przydatności wykrywania przeciwciał przeciwprątkowych w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego w rozpoznaniu gruźlicy w porównaniu z metodami mikrobiologicznymi i genetycznymi.

Materiał i metody

Badano materiał pochodzący od 79 chorych. W tej grupie było 49 chorych na gruźlicę płuc oraz 30 chorych na inne choroby układu oddechowego

(sarkoidoza, zapalenie płuc, rak płuca). U wszystkich chorych na gruźlicę uzyskano potwierdzenie bakteriologiczne w BALF, u 25 chorych wykryto ponadto w BALF kwas deoksyrybonukleinowy lub kwas rybonukleinowy prątka metodą genetyczną.

U chorych z grupy kontrolnej wykluczono czynną gruźlicę płuc (badanie mikrobiologiczne w BALF i/lub histologiczne).

Materiał do badań został pobrany w czasie bronchofiberoskopii. Płyn uzyskany podczas BALF filtrowano przez gazę młyńską w celu zmniejszenia zawartości śluzu, następnie wirowano przy 3000 obrotach na minutę przez 15 minut. Odwirowany nadsącz rozlewano po 1 ml do probówek i zamrażano w temperaturze -70°C . Do analizy — w związku z brakiem wystandaryzowanej metody do oznaczania przeciwciał przeciwprątkowych w BALF — używano świeżo rozmrożonych nadsączów rozcieńczonych w stosunku 1 : 10 i nierozcieńczonych.

U wszystkich chorych rozpoznano gruźlicę w BALF za pomocą systemu radiometrycznego BACTEC 460TB. Jako metodę genetyczną zastosowano łańcuchową reakcję polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*). Do badań użyto testów do bezpośredniego wykrywania *Mycobacterium tuberculosis* w materiale klinicznym MTD Gen-Probe firmy Bio Merieux i testów genetycznych BD Probe-TecTM firmy Becton Dickinson.

Metoda immunoenzymatyczna ELISA

Do oceny odpowiedzi humoralnej na antygeny prątka wykorzystano testy immunoenzymatyczne, które wykrywały następujące przeciwciała:

- IgG anty38kDa + 16kDa (Pathozyme tb complex plus, Omega Diagnostics Scotland);
- IgG anty38kDa + LAM (Myco G, Omega Diagnostics Scotland);
- IgA anty38kDa + LAM (Myco A, Omega Diagnostics Scotland);
- IgM anty38kDa + LAM (Myco M, Omega Diagnostics Scotland).

Zastosowane testy ELISA były oparte na rekombinowanych antygenach prątków: 38kDa, 16kDa i lipoarabinomannanie (LAM). Antygen 38kDa jest antygenem dominującym i swoistym dla *Mycobacterium Tuberculosis Complex* (MTB) [4, 8]. Antygen ten nie występuje u prątków niegruźliczych [9].

Antygen 16kDa jest swoisty dla MTB, immunodominujący dla *Mycobacterium tuberculosis* i stosuje się go łącznie z 38kDa w celu zwiększenia czułości testów serologicznych w gruźlicy [10]. Lipoarabinomannan (LAM) jest to antygen obecny w ścianie komórkowej wielu gatunków prątków, będący silnym aktywatorem odpowiedzi typu komórkowego [9].

Antygeny prątków 38kDa i 16kDa, 38kDa i LAM były opłaszczane na 96-dołkowej mikropłytkę, na którą nanoszono badany materiał. Przeciwciała obecne w BALF wiązały się z antygenem. Do tego kompleksu dodawano następnie przeciwciało mostowe anti-IgG, anti-IgA lub anti-IgM znakowane enzymatycznie i substrat, który uruchamia reakcję barwną. Przy użyciu czytnika spektrofotometrycznego ELX800 firmy Biotec mierzono natężenie reakcji barwnej. Wynik prezentowano jako indeks gęstości optycznej półilościowo dla przeciwciała IgM lub ilościowo w jednostkach dla pozostałych klas przeciwciał. Miano przeciwciał w próbce obliczano na podstawie krzywej standardowej, którą wyznaczano na podstawie gęstości optycznych próbek standardowych.

Producent testów zastosowanych do oznaczeń zaleca rozcieńczenie badanego materiału 1 : 100 dla testów Myco G, Myco A, Myco M i 1 : 50 dla Pathozyme tb complex plus. Za wyniki dodatnie uznano — zgodnie z przelicznikiem rozcieńczeń — stężenia przeciwciał powyżej wartości:

- dla klasy IgG anty38kDa + 16kDa — powyżej 4 j./ml;
- dla klasy IgG anty38kDa + LAM — powyżej 4 j./ml;
- dla klasy IgA anty38kDa + LAM — powyżej 3 j./ml;
- dla klasy IgM anty38kDa + LAM — powyżej 0,458 OD.

Czułość i swoistość użytego testu ELISA obliczono według schematu [11]:

- A — wynik prawdziwie dodatni (przeciwciała obecne u chorych na gruźlicę);
- B — wynik fałszywie dodatni (przeciwciała obecne u chorych na inne choroby płuc);
- C — wynik fałszywie ujemny (brak przeciwciał u chorych na gruźlicę);
- D — wynik prawdziwie ujemny (brak przeciwciał u chorych na inne choroby płuc).

Czułość testu = $A : (A + C) \times 100\% = \%$ wyników prawdziwie dodatnich.

Swoistość testu = $D : (B + D) \times 100\% = \%$ wyników prawdziwie dodatnich.

Ocena statystyczna

W analizie statystycznej wykorzystano test U Manna-Whitneya dla rozkładu nienormalnego. Aby sprawdzić korelację pomiędzy zmiennymi, zastosowano współczynnik korelacji Pearsona. Znamienność statystyczna została uznana na poziomie istotności poniżej 0,05. Obliczenia przeprowadzono przy użyciu programu Microsoft Office Excel 2000 i pakietu statystycznego S-PLUS 2000.

Wyniki

Częstość wykrywania przeciwciał przeciwko antygenom *Mycobacterium tuberculosis* w BALF nierozcieńczonym i rozcieńczonym 10-krotnie przedstawiono w tabelach 1 i 2. W przypadku większości próbek rozcieńczenie 1 : 10 okazało się zbyt duże (tab. 2), zatem dalsze badania wykonano z użyciem próbek nierozcieńczonych. Przeciwciała klasy IgG przeciwko antygenom 38kDa + 16kDa i 38kDa + LAM wykryto odpowiednio u 49% i 33% chorych na gruźlicę. Wynik testu opartego na przeciwciałach klasy IgA przeciwko antygenom 38kDa + + LAM był dodatni u wszystkich chorych na gruźlicę. Przeciwciała IgM przeciwko antygenom 38kDa + + LAM wykryto w BALF u 35% chorych na gruźlicę.

U 13% chorych na inne choroby płuc wykryto przeciwciała klasy IgG przeciwko antygenom 38kDa + 16kDa, natomiast przeciwciała anti IgG 38kDa + LAM wykryto w 7% badanych próbek. Test oparty na przeciwciałach klasy IgA przeciwko antygenom 38kDa + LAM był dodatni u 87% chorych na inne choroby płuc. Przeciwciała IgM przeciwko antygenom 38kDa + LAM wykryto u 17% chorych na inne choroby płuc.

W tabeli 3 zaprezentowano czułość i swoistość badanych testów. Czułość testu wykrywającego przeciwciała IgG przeciwko antygenom 38kDa + + 16kDa wynosiła 49%, swoistość tego testu była dość wysoka — 87%. W przypadku przeciwciał klasy IgG anty38kDa + LAM czułość testu wyniosła 33%, przy swoistości 93%. Dla przeciwciał klasy IgM anty38kDa + LAM swoistość testu wyniosła 75%, a czułość — 35%. Oparty na antygenie anti-IgA test odznaczał się najwyższą czułością — 100% — ale jego swoistość wyniosła tylko 13%.

W tabeli 4 przedstawiono stężenia przeciwciał przeciwko antygenom *M. tuberculosis* u chorych na gruźlicę i chorych na inne choroby płuc.

Średnie stężenie przeciwciał klasy IgG anty38kDa + 16kDa przeciwko antygenom prątków

Tabela 1. Częstość występowania przeciwciał przeciwko antygenom *Mycobacterium tuberculosis* w nierozcieńczonym BALF u chorych na gruźlicę płuc potwierdzoną bakteriologicznie lub na inne choroby płuc**Table 1. The frequency of antimycobacterial antibodies in undiluted BALF from patient with pulmonary tuberculosis or with other lung diseases**

	IgG anty38kDa + 16 kDa	IgG anty38kDa + LAM	IgA anty38kDa + LAM	IgM anty38kDa + LAM
Chorzy na gruźlicę (liczba) <i>Patients with Tb (number)</i>	49	49	49	49
Liczba i procent chorych z przeciwciałami <i>Number and percentage of patients with antibodies</i>	24 (49%)	16 (33%)	49 (100%)	17 (35%)
Chorzy na inne choroby płuc (liczba) <i>Patients with other lung diseases (number)</i>	30	30	30	30
Liczba i procent chorych z przeciwciałami <i>Number and percentage of patients with antibodies</i>	4 (13%)	2 (7%)	26 (87%)	5 (17%)

Tabela 2. Częstość wykrywania przeciwciał przeciwko antygenom *Mycobacterium tuberculosis* w 10-krotnie rozcieńczonym BALF u chorych na gruźlicę płuc potwierdzoną bakteriologicznie**Table 2. The frequency of antimycobacterial antibodies in 10 times diluted BALF from patients with culture positive pulmonary tuberculosis**

	IgG anty38kDa + 16 kDa	IgG anty38kDa + LAM	IgM anty38kDa + LAM	IgA anty38kDa + LAM
Chorzy na gruźlicę (liczba) <i>Patients with Tb (number)</i>	49	49	49	49
Liczba i procent chorych z przeciwciałami <i>Number and percentage of patients with antibodies</i>	3 (6%)	3 (6%)	3 (6%)	4 (8%)

Tabela 3. Czułość i swoistość badanych testów ELISA**Table 3. Sensitivity and specificity of examined ELISA tests**

	IgG anty38kDa + 16 kDa	IgG anty38kDa + LAM	IgM anty38kDa + LAM	IgA anty38kDa + LAM
Czułość <i>Sensitivity</i>	49%	33%	35%	100%
Swoistość <i>Specificity</i>	87%	3%	75%	13%

wynosiło $9,84 \pm 6,87$ [j./ml] dla grupy chorych na gruźlicę i $9,49 \pm 10,17$ [j./ml] dla grupy kontrolnej, którą stanowili chorzy na inne choroby płuc. Różnica ta nie jest istotna statystycznie ($p > 0,05$).

Dla przeciwciał klasy IgG anty38kDa + LAM nie przeprowadzano analizy statystycznej. Liczebność grupy kontrolnej, czyli chorych na inne choroby płuc, którzy produkowali przeciwciała przeciwko *M. tuberculosis*, wynosiła tylko 2 osoby.

Średnie stężenie przeciwciał klasy IgA anty38kDa + LAM oznaczone dla grupy kontrolnej wynosiło $11,48 \pm 8,95$ [j./ml] i nie różniło się istot-

nie statystycznie ($p > 0,05$) od stężenia przeciwciał w grupie chorych z gruźlicą — $17,49 \pm 12,66$ [j./ml].

Stwierdzono statystycznie znamiennej różnicę ($p < 0,05$) w stężeniach przeciwciał klasy IgM anty38kDa + LAM pomiędzy grupą chorych na gruźlicę — $1,85 \pm 1,70$, a grupą chorych na inne choroby płuc — $0,56 \pm 0,06$.

W tabeli 5 przedstawiono stężenia przeciwciał przeciwko antygenom *M. tuberculosis* u chorych na gruźlicę, u których test genetyczny był dodatni, w porównaniu z chorymi na inne choroby płuc.

Tabela 4. Stężenie przeciwciał przeciwko antygenom *Mycobacterium tuberculosis* u chorych na gruźlicę płuc potwierdzoną bakteriologicznie i u chorych na inne choroby płuc zdiagnozowane metodą hodowli w systemie BACTEC**Table 4. Antimycobacterial antibody level in patients with culture positive pulmonary tuberculosis and in patients with other lung diseases**

Cecha Feature	IgG anty38kDa + 16 kDa [j./ml]		IgG anty38kDa + LAM [j./ml]		IgM anty38kDa + LAM OD		IgA anty38kDa + LAM [j./ml]	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Liczebność grupy Number of pts	24	4	16	2	17	5	49	26
Średnia Mean	9,84	9,49	9,90	5,55	1,85	0,56	17,49	11,48
SD	± 6,87	± 10,17	± 7,31	—	± 1,70	± 0,06	± 12,66	± 8,95
Najniższe stężenie przeciwciał The lowest level of antibodies	4,01	4,24	4,36	4,299	0,46	0,50	3,71	3,37
Najwyższe stężenie przeciwciał The highest level of antibodies	30,67	24,75	26,37	6,816	5,95	0,64	53,06	40,80
	p = 0,294		—		p = 0,014		p = 0,053	

A — chorzy na gruźlicę płuc potwierdzoną bakteriologicznie, u których wykryto przeciwciała/patients with culture positive pulmonary Tb and with antibody

B — chorzy na inne choroby płuc, u których wykryto przeciwciała/patients with other lung diseases and with antibody

SD (standard deviation) — odchylenie standardowe

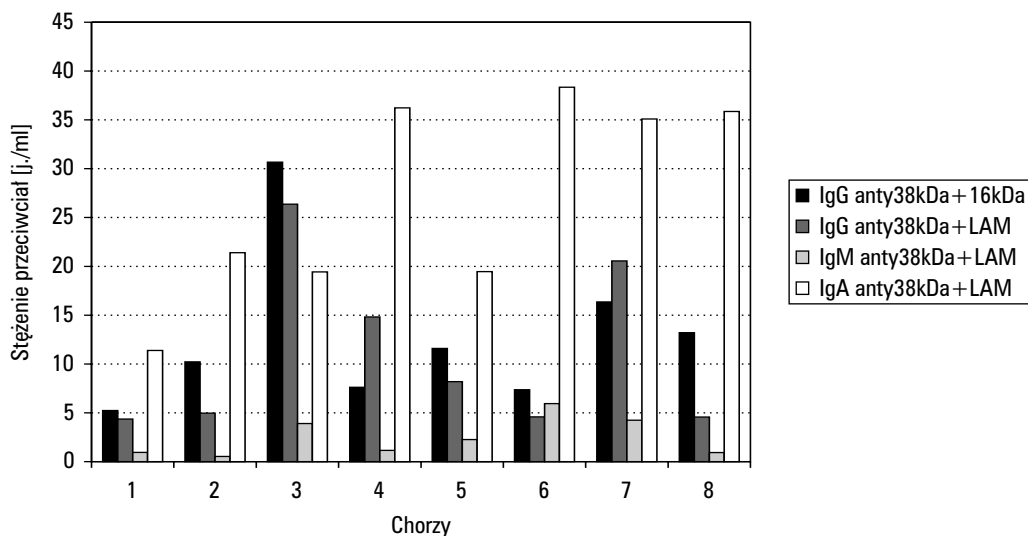
Tabela 5. Stężenie przeciwciał przeciwko antygenom *Mycobacterium tuberculosis* u chorych na inne choroby płuc i u chorych na gruźlicę płuc potwierdzoną bakteriologicznie, u których metodą PCR wykazano obecność materiału genetycznego prątków gruźlicy**Table 5. Antimycobacterial antibody level in patients with culture positive pulmonary tuberculosis with positive PCR and in patients with other lung diseases**

Cecha Feature	IgG anty38kDa + 16 kDa [j./ml]		IgG anty38kDa + LAM [j./ml]		IgM anty38kDa + LAM OD		IgA anty38kDa + LAM [j./ml]	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Liczebność grupy i procent chorych Number and percentage of patients	13 52%	4 16%	10 40%	2 8%	12 48%	4 16%	25 100%	16 64%
Średnia Mean	6,07	5,28	7,22	5,69	0,91	1,97	14,10	14,73
SD	± 3,94	± 1,47	± 4,62	—	± 1,09	± 2,65	± 12,87	± 12,91
Najniższe stężenie przeciwciał The lowest level of antibodies	4,06	4,18	4,00	4,57	0,45	0,51	3,84	3,37
Najwyższe stężenie przeciwciał The highest level of antibodies	15,991	7,37	18,01	6,81	4,24	5,95	53,06	40,80
	p = 0,734		—		p = 0,467		p = 0,936	

A — chorzy na gruźlicę płuc potwierdzoną bakteriologicznie, u których wykryto przeciwciała/patients with culture positive pulmonary Tb and with antibody

B — chorzy na inne choroby płuc, u których wykryto przeciwciała/patients with other lung diseases and with antibody

SD (standard deviation) — odchylenie standardowe



Rycina 1. Stężenia przeciwciał u chorych produkujących IgG, IgA i IgM przeciwko badanym antygenom

Figure 1. IgG, IgA and IgM level against examined antigens

Średnie stężenie przeciwciał w klasie IgG anty38kDa + 16kDa dla chorych, u których wykryto materiał genetyczny prątka, wynosiło $6,07 \pm 3,94$ [j./ml], a dla grupy chorych na inne choroby płuc — $5,28 \pm 1,47$ [j./ml]. Różnica nie była znamienna statystycznie ($p > 0,05$).

Nie stwierdzono istotnej różnicy w stężeniu IgM anty38kDa + 16kDa u chorych na gruźlicę — $0,91 \pm 1,09$ [j./ml] i w grupie kontrolnej — $1,97 \pm 2,65$ [j./ml] ($p > 0,05$).

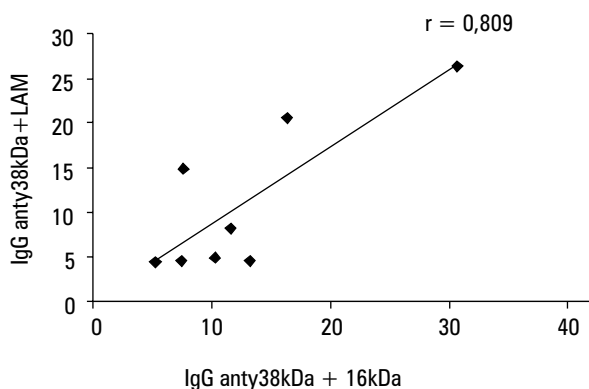
Średnie stężenie IgA anty38kDa + LAM u chorych na gruźlicę wynosiło $14,10 \pm 12,87$ [j./ml], a w grupie kontrolnej $14,73 \pm 12,91$ [j./ml]. Różnica nie była istotna statystycznie ($p > 0,05$).

Nie przeprowadzano analizy statystycznej w odniesieniu do IgG anty38kDa + LAM, ponieważ tylko 2 osoby z grupy kontrolnej produkowały takie przeciwciała.

Dla 8 pacjentów wykazano istnienie znamiennej statystycznie dodatniej korelacji ($p = 0,015$) pomiędzy IgG anty38kDa + LAM a IgG anty38kDa + 16kDa, co sugeruje, że wraz ze wzrostem IgG anty38kDa + 16kDa rosną wartości IgG anty38kDa + LAM (ryc. 1 i 2).

Omówienie

Wniknięcie do organizmu człowieka *M. tuberculosis* pobudza zarówno mechanizmy odpowiedzi komórkowej, jak i odpowiedzi humoralnej [3, 4]. Powszechnie uważa się, że znaczenie obronne mają jedynie mechanizmy komórkowe, natomiast rola swoistych przeciwciał przeciwprątkowych jest niejasna [9, 10, 12]. Cechy swoistego pobudzenia od-



Rycina 2. Korelacja stężeń przeciwciał IgG anty 38kDa + LAM i IgG anty38kDa + 16kDa

Figure 2. Correlation between IgG ant:38kDa + LAM and IgG ant:38kDa + 16kDa antibody level

powiedzi immunologicznej próbuje się wykorzystać do celów diagnostycznych. Stężenie przeciwciał przeciwko antygenom prątka można oceniać w surowicy chorych, ale obecność tego typu przeciwciał stwierdza się również w płynach pochodzących z zajętych chorobowo narządów [10, 12].

W niniejszej pracy oceniono odpowiedź humoralną na antygeny prątka w płynie pochodzącym z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego za pomocą komercyjnie dostępnych testów serologicznych. Stwierdzono podwyższenie stężenia przeciwciał klasy IgG i IgA przeciwko antygenom 38kDa + LAM i IgG anty38kDa + 16kDa u chorych na gruźlicę płuc potwierdzoną bakteriologicznie. W większości przypadków stężenie przeciwciał IgM anty38kDa + LAM było niskie, ale tylko w tej klasie immunoglobulin

zaobserwowano istotne statystycznie różnice pomiędzy stężeniem przeciwciał u chorych na gruźlicę płuc a stężeniem przeciwciał u chorych na inne choroby płuc. Dubaniewicz i wsp., badając stężenie IgM, stwierdzili, że wartości tych przeciwciał u osób z nieczynną gruźlicą i u chorych na czynną gruźlicę po 2 miesiącach leczenia były zbliżone do wartości kontrolnych [13]. Metody immunoenzymatyczne do oznaczania przeciwciał przeciwprątkowych zarówno w surowicy, jak i w płynie BALF badali Grubek-Jaworska i wsp. [14], nie stwierdzili jednak istotnych różnic pomiędzy grupą kontrolną a grupą chorych.

Przeciwciała przeciwprątkowe w klasie IgG występowały również znacznie częściej u chorych, u których oprócz dodatniego wyniku posiewu wykryto także materiał genetyczny prątka. Brakowało natomiast statystycznie istotnych różnic w stężeniach IgM i IgA pomiędzy grupą chorych na gruźlicę płuc a grupą kontrolną. Potwierdza to obserwacje wskazujące, że przeciwciała klasy IgG lepiej korelują z występowaniem aktywnej postaci gruźlicy niż przeciwciała innych klas [10, 12, 15–17].

Występowanie przeciwciał przeciwko antygenom *M. tuberculosis* u osób chorych na inne choroby płuc niż gruźlica może być spowodowane powtarzanymi szczepieniami przeciwgruźliczymi (BCG, *Bacillus-Calmette-Guerain*) oraz kontaktem z prątkami atypowymi w środowisku [10, 16]. Wiadomo, że odpowiedź immunologiczna na antygeny prątka zależy od czynników osobniczych, geograficzno-środowiskowych czy genetycznych [8, 10].

W niniejszej pracy najwyższą czułość badanych testów obserwowano w klasie IgA, ze względu jednak na bardzo niską swoistość niecelowe wydaje się ich wykorzystanie w diagnostyce. Być może wysokie stężenie IgA wiąże się z nasiloną produkcją tej immunoglobuliny w drogach oddechowych pod wpływem stymulacji antygenowej po zakażeniu prątkiem gruźlicy lub w wyniku reakcji krzyżowych z antygenami innych gatunków prątków, z którymi organizm kontaktuje się w ciągu całego życia (szczepienia, mykobakterie środowiskowe).

Słabą odpowiedź humoralną na antygeny prątka gruźlicy u niektórych chorych na gruźlicę można powiązać z fazą choroby. U chorych, u których proces chorobowy trwa ponad 3 miesiące, pojawia się znaczące miano przeciwciał. W trakcie stosowania leczenia miano to rośnie przez 1–2 miesiące, a potem stopniowo się zmniejsza [17]. Słaba stymulacja antygenowa, na przykład w gruźlicy skąpoprątkowej, i minimalne zmiany chorobowe mogą być przyczyną niskich stężeń przeciwciał przeciwko antygenom *Mycobacterium tuberculosis* u niektórych chorych na gruźlicę [10, 18].

Metody serologiczne są proste do wykonania, stosunkowo tanie, mają krótki czas wykonania, a dodatkową zaletą jest również niewielka ilość materiału od chorego potrzebna do wykonania badania. W zależności od zastosowanego antygeny i badanej populacji testy serologiczne różnią się czułością i swoistością [3]. W pracy tej wykazano, że użyte testy ELISA charakteryzują się niewielką przydatnością w wykrywaniu gruźlicy. Najlepszą przydatnością diagnostyczną cechował się test oparty na przeciwciałach klasy IgG przeciwko antygenom 38kDa i LAM.

Pomimo istotnych ograniczeń badanych testów nadal wiele nadziei pokłada się w udoskonalonych technikach serologicznych [19, 20]. Obecnie dostępne techniki serologiczne nie mogą zastąpić metod mikrobiologicznych, ale mogą być ich uzupełnieniem. Nadal trwają intensywne badania dotyczące budowy antygenowej prątka i próby wyizolowania nowych antygenów, które mogłyby się stać bazą dla udoskonalonych testów serologicznych.

Wnioski

1. Gruźlica wywołana przez *Mycobacterium tuberculosis* prowadzi do pobudzenia odpowiedzi humoralnej na antygeny prątka objawiającej się podwyższeniem stężenia przeciwciał klasy IgG i IgA w BALF.
2. Stężenie przeciwciał klasy IgG anty38kDa + + 16kDa koreluje z IgG anty38kDa + LAM.
3. Użyte testy komercyjne ELISA okazały się mało przydatne w diagnostyce gruźlicy w BALF ze względu na niską czułość i swoistość.
4. Najlepszą wartość diagnostyczną miał test oparty na przeciwciałach IgG anty38kDa + + LAM.
5. Wyniki testów serologicznych lepiej korelują z wynikami badań mikrobiologicznych niż badań genetycznych.

Piśmiennictwo

1. Kochi A. The global Tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1991; 72: 1–3.
2. Lechowicz-Szynalik Z. Sytuacja epidemiologiczna gruźlicy w Polsce na początku XXI wieku. *Acta Pneumologica et Allergologica Paediatrica* 2004; 7: 44–45.
3. Banaszkiewicz A., Feleszko W. Zjawiska immunologiczne w gruźlicy u dzieci. *Pol. Merk. Lek.* 2003; 15: 203–207.
4. Copper A., Flynn J.L. The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Opin. Immunol.* 1995; 7: 512–516.
5. Bassey E.O., Life P.F., Catty D., Gaston J.S.H., Kumararatne D.S. T cell response to *Mycobacterium*. *Tuberc. Lung Dis.* 1996; 77: 146–153.
6. Gupta S., Bhatia R., Datta K.K. Serological diagnosis of childhood tuberculosis by estimation of mycobacterial antigen 60 specific immunoglobulins in the serum. *Tuberc. Lung Dis.* 1997; 78: 21–28.

7. Maes R. Clinical usefulness of serological measurements obtained by antigen 60 in mycobacterial infections: development of new concept. *Klin. Wochenschr.* 1991; 69: 669.
8. Ravn P., Boesen H., Pedersen B.K. i wsp. Human T cell response induced by vaccination with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin. *J. Immunol.* 1997; 158: 1949–1955.
9. Coates A.R.M., Hewitt J., Allen B.W. i wsp. Antigenic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies. *Lancet* 1981; 2: 167–169.
10. Demkow U.A. Odpowiedź humoralna na antygeny prątka w różnych postaciach gruźlicy i jej wartość diagnostyczna. *Bi-blioteka Rozpraw Habilitacyjnych. I.G.iCh.P.*, 2004; 9–11.
11. Gościński G. Przeciwciała w zakażeniach *Helicobacter pylori*. *Akademia Medyczna we Wrocławiu, Wrocław* 2002; 42–43.
12. Demkow U.A., Zielonka T.M., Filewska M. i wsp. IgG mediated immune response against mycobacterial antigen 38-kDa and 16-kDa in extrapulmonary tuberculosis. *Allergy Clin. Immun. Intern.* 2000; supl. 2: 209.
13. Dubaniewicz A., Sztaba-Kania M., Hoppe A. Analiza wybranych parametrów immunologicznych w gruźlicy płuc. *Pol. Merk. Lek.* 2004; XVI: 92, 123–125.
14. Grubek-Jaworska H., Zwolska Z., Droszcz P. i wsp. Serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) IgG against A60 and 38kDa (ELISA assays) in diagnosis of tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 1997; 1: 556–562.
15. Bonar A., Chmiela M., Różalska B. Przeciwciała klasy IgG przeciwko antygenom sonikatu *Mycobacterium tuberculosis* (Mts). Użyteczność testu ELISA-Mts. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2004; 72: 206–208.
16. Demkow U.A., Zielonka T.M., Michałowska-Mitczuk D. i wsp. Przydatność oznaczania w surowicy przeciwciał IgG przeciwko antygenowi A60 w diagnostyce gruźlicy płuc. *Polskie Arch. Med. Wew.* 1999; 101: 99–105.
17. Zielonka T.M., Demkow U.A., Filewska M. i wsp. Przydatność oznaczania różnej klasy przeciwciał przeciwprątkowych anty A-60 w rozpoznawaniu gruźlicy. *Pol. Merk. Lek.* 2002; XII: 486–488.
18. Dhand R., De A., Ganguly N.K. i wsp. Factors influencing the cellular response in bronchoalveolar lavage and peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. *Tubercle* 1988; 69: 161–173.
19. Harboe M., Wiker H.G. The 38-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. *J. Infect. Dis.* 1992; 166: 874–884.
20. Tan J.S., Canday D.H., Boom H. i wsp. Human alveolar T lymphocyte responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *J. Immunol.* 1997; 159: 290–297.