

lek. Agnieszka Strzelak

**Możliwości zastosowania oznaczenia IP-10 w diagnostyce
zakażenia latentnego *Mycobacterium tuberculosis*
i aktywnej gruźlicy u dzieci**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. Marek Kulus

Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Lekarski
Klinika Pneumonologii i Alergologii Wieku Dziecięcego



KIEROWNIK KLINIKI

Prof. dr hab. med. Marek Kulus

Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscyplin Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

WARSZAWA 2022 r.



STRESZCZENIE

Tytuł: Możliwości zastosowania oznaczenia IP-10 w diagnostyce zakażenia latentnego *Mycobacterium tuberculosis* i aktywnej gruźlicy u dzieci.

Gruźlica dziecięca pozostaje wyzwaniem diagnostycznym z powodu skąpoprątkowego charakteru oraz niespecyficznych objawów choroby u najmłodszych pacjentów. Identyfikację dzieci z utajonym zakażeniem prątkiem gruźlicy utrudniają brak „złotego standardu” diagnostycznego oraz ograniczenia dostępnych testów immunologicznych, takich jak odczyn tuberkulinowy (TST) i testy oceniające uwalnianie interferonu- γ (IFN- γ). Jednym z obiecujących nowych biomarkerów zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* jest białko o masie cząsteczkowej 10 kDa indukowane przez IFN- γ (ang. interferon-gamma-inducible protein of 10 kDa, IP-10).

Celem niniejszej pracy była ocena przydatności oznaczenia stężenia IP-10 w diagnostyce utajonego zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* i aktywnej gruźlicy oraz w monitorowaniu leczenia przeciwprątkowego u dzieci. Cel ten zrealizowano poprzez oznaczenie stężenia IP-10 w surowicy (część pierwsza) oraz w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (część druga) u dzieci diagnozowanych w kierunku zakażenia prątkiem gruźlicy.

Posłużyła temu realizacja celów szczegółowych, obejmujących:

- 1) Oznaczenie stężenia IP-10 po stymulacji antygenami prątka, mitogenem oraz bez stymulacji antygenowej w surowicy, oznaczenie średniego stężenia i zakresu stężeń w każdej z badanych grup.
- 2) Ocena wydzielania IP-10 po stymulacji mitogenem i antygenami prątka gruźlicy w zależności od wieku.
- 3) Oznaczenie stężenia IP-10 przed i w trakcie leczenia przeciwprątkowego u dzieci z aktywną gruźlicą oraz z utajonym zakażeniem prątkiem gruźlicy.
- 4) Ocena wartości diagnostycznej IP-10 po stymulacji swoistymi antygenami prątka w różnicowaniu dzieci zakażonych i niezakażonych *Mycobacterium tuberculosis*, wyznaczenie punktu odcięcia dla wyniku dodatniego.
- 5) Porównanie wyników IP-10 z wynikami TST i QuantiFERON-TB Gold In Tube (QFT-GIT).
- 6) Ocena czułości i swoistości IP-10 w diagnozowaniu aktywnej gruźlicy u dzieci w porównaniu do TST i QFT-GIT.

- 7) Oznaczenie stężenia IP-10 bez stymulacji antygenowej w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego u dzieci zakażonych *Mycobacterium tuberculosis* oraz u dzieci z innymi chorobami układu oddechowego, oznaczenie średniego stężenia i zakresu stężeń w każdej z badanych grup.
- 8) Porównanie stężenia IP-10 bez stymulacji antygenowej w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego do stężenia IP-10 bez stymulacji antygenowej w surowicy.
- 9) Ocena wydzielania IP-10 bez stymulacji antygenowej w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego w zależności od wieku.

Do pierwszej części badania włączono dzieci i młodzież w wieku 0-18 r.ż. z podejrzeniem zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* lub z podejrzeniem aktywnej gruźlicy. Analizą objęto 225 (85,6%) z 263 zakwalifikowanych do udziału w badaniu pacjentów. Grupę badaną stanowiło 33 dzieci z aktywną gruźlicą, 48 dzieci z utajonym zakażeniem prątkiem, 83 niezakażonych dzieci z kontaktu z gruźlicą oraz 20 objawowych pacjentów z innym ostatecznym rozpoznaniem. Do grupy kontrolnej włączono 41 dzieci bez podwyższonego ryzyka zakażenia prątkiem. U wszystkich badanych przeprowadzono badanie podmiotowe i przedmiotowe ze szczególnym uwzględnieniem objawów charakterystycznych dla gruźlicy, wykonano QFT-GIT oraz oznaczono stężenie IP-10 w surowicy po stymulacji mitogenem, swoistymi antygenami prątka i bez stymulacji antygenowej. U 171 dzieci wykonano TST.

Wykazano istotny wzrost stężenia IP-10 po stymulacji swoistymi antygenami prątka jedynie u dzieci zakażonych prątkiem gruźlicy. Obserwowane stężenia IP-10 były wyższe w grupie dzieci zakażonych prątkiem niż w grupie dzieci niezakażonych ($p < 0,000001$). Wśród dzieci z klinicznym podejrzeniem gruźlicy obserwowano wyższe stężenia IP-10 w grupie z aktywną gruźlicą w porównaniu do dzieci, u których ostatecznie rozpoznano inną chorobę ($p = 0,000087$). W grupie dzieci z wywiadem kontaktu z gruźlicą stężenie IP-10 było wyższe u dzieci zakażonych prątkiem w porównaniu do dzieci niezakażonych ($p < 0,000001$).

Odnotowano marginalną zależność pomiędzy stężeniem IP-10 po stymulacji mitogenem a wiekiem ($r_s = 0,16$; $p = 0,016$) oraz słabą zależność pomiędzy stężeniem IP-10 po stymulacji swoistymi antygenami prątka a wiekiem ($r_s = 0,32$; $p = 0,00000$).

Po dwóch miesiącach leczenia przeciwprątkowego wykazano istotne statystycznie obniżenie stężenia IP-10 po stymulacji swoistymi antygenami prątka w grupie dzieci z aktywną gruźlicą ($p = 0,003$). Nie stwierdzono istotnego statystycznie zmniejszenia stężenia IFN- γ

u dzieci z aktywną gruźlicą. Nie odnotowano istotnej zmiany stężenia badanych biomarkerów w grupie dzieci z zakażeniem utajonym i niezakażonych dzieci z kontaktu z gruźlicą.

Za pomocą analizy krzywych ROC (ang. *Receiver Operating Characteristic*) oraz pola powierzchni pod krzywą ROC (ang. *Area Under Curve*, AUC) wykazano bardzo dobrą wartość dyskryminacyjną IP-10 po stymulacji swoistymi antygenami prątką w identyfikowaniu dzieci zakażonych prątkiem gruźlicy (AUC = 0,961). Nie wykazano wartości diagnostycznej IP-10 w rozróżnianiu pacjentów z gruźlicą aktywną od osób z zakażeniem utajonym. Przy wyznaczonym optymalnym punkcie odcięcia dla wyniku dodatniego (1084,5 pg/ml), IP-10 wykazało czułość na poziomie 93%, swoistość na poziomie 94%, dobrą wartość predykcyjną dodatnią (84%) i ujemną (97%) w identyfikacji zakażenia *Mycobacterium tuberculosis*. Uzyskano znaczącą zgodność wyników IP-10 i TST oraz IP-10 i QFT-GIT ($\kappa = 0,69$).

Wykazano, że starszy wiek dziecka oraz kontakt z chorym na gruźlicę płuc zwiększają szanse na uzyskanie dodatniego wyniku TST, QFT-GIT i IP-10.

W diagnostyce gruźlicy aktywnej IP-10 wykazało większą czułość niż QFT-GIT, ale mniejszą niż TST (79% vs 72% vs 93%). Swoistość IP-10 przewyższyła swoistość TST (81% vs 69%), ale nie QFT-GIT (81% vs 83%). Łączne zastosowanie IP-10 i QFT-GIT pozwoliło na zwiększenie czułości do 88%.

Do udziału w drugiej części badania kwalifikowano dzieci diagnozowane w kierunku gruźlicy, u których wykonywano bronchofiberoskopię. Grupę kontrolną stanowiły dzieci z innymi chorobami układu oddechowego, u których przeprowadzono bronchofiberoskopię z płukaniem oskrzelowo-pęcherzykowym. Do ostatecznej analizy włączono 35 pacjentów, 13 do grupy badanej i 22 do grupy kontrolnej. Wśród 13 pacjentów włączonych do grupy badanej u 12 potwierdzono zakażenie prątkiem - u 3 pacjentów rozpoznano aktywną gruźlicę, a u 9 utajone zakażenie prątkiem gruźlicy. Do grupy kontrolnej włączono 5 pacjentów z astmą, 6 z chorobą śródmiąższową płuc, 4 pacjentów z wadą płuca oraz 7 z chorobami infekcyjnymi układu oddechowego.

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniu IP-10 w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego i w surowicy pomiędzy grupami. Stężenie IP-10 w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego było znacząco wyższe od stężenia IP-10 w surowicy ($p = 0,008$). Odnotowano umiarkowaną korelację pomiędzy stężeniem IP-10 w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego i stężeniem IP-10 w surowicy ($r_s = 0,46$, $p = 0,018$). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy stężeniem IP-10 w płynie z płukania oskrzelowo-

pęcherzykowego i w surowicy a wiekiem (odpowiednio $r_s = -0,026$, $p = 0,9$ i $r_s = -0,032$, $p = 0,85$).

Analiza uzyskanych wyników pozwoliła na sformułowanie następujących wniosków:

- 1) Ocena stężenia IP-10 po stymulacji swoistymi antygenami prątka w surowicy pozwala na identyfikację dzieci zakażonych prątkiem gruźlicy, zarówno wśród dzieci diagnozowanych z powodu podejrzenia klinicznego aktywnej choroby, jak i z powodu kontaktu z chorym na gruźlicę płuc.
- 2) Brak istotnej zależności pomiędzy stężeniem IP-10 po stymulacji mitogenem od wieku pozwala na wykorzystanie tego biomarkera w grupie najmłodszych dzieci.
- 3) Ocena stężenia IP-10 po stymulacji swoistymi antygenami prątka w surowicy może być badaniem pomocniczym do oceny skuteczności leczenia przeciwprątkowego u dzieci z aktywną gruźlicą.
- 4) Zastosowanie punktu odcięcia $> 1084,5$ pg/ml dla stężenia IP-10 po stymulacji swoistymi antygenami prątka ułatwia identyfikowanie dzieci zakażonych *Mycobacterium tuberculosis*. Badanie to nie umożliwia rozróżnienia pacjentów z aktywną gruźlicą od osób z utajonym zakażeniem prątkiem gruźlicy.
- 5) Znacząca zgodność wyników IP-10 z wynikami TST i QFT-GIT świadczy o przydatności IP-10 w diagnozowaniu zakażenia prątkiem gruźlicy.
- 6) IP-10 nie ma przewagi nad TST w diagnostyce gruźlicy aktywnej, natomiast przewyższa w tym względzie QFT-GIT. Z powodu niezadawalającej czułości ujemny wynik IP-10 nie może służyć do wykluczania gruźlicy aktywnej u dzieci. Dołączenie oznaczenia IP-10 do QFT-GIT może się przyczynić do zwiększenia czułości metody.
- 7) U dzieci z chorobami układu oddechowego możliwe jest oznaczenie stężenia IP-10 bez stymulacji antygenowej w płynie z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego.
- 8) U dzieci z chorobami układu oddechowego stężenie IP-10 w BALF jest wyższe od stężenia tej chemokiny w surowicy, co może odzwierciedlać nasilenie lokalnej reakcji zapalnej w płucach.
- 9) Stężenia IP-10 bez stymulacji w BALF nie są zależne od wieku i mogą być wykorzystane także u najmłodszych pacjentów.