

Zdravstvena zaštita

Health care

KOJIM PPD-HIPERREAKTORIMA TREBA DATI PROFILAKSU – NAŠA ISKUSTVA

WHICH TUBERCULIN SKIN TEST HYPERREACTIVE CHILD SHOULD BE TREATED WITH – OUR EXPERIENCE

IVAN PAVIĆ, IVA HOJSAK, LJILJANA ŽMAK, DORIAN TJEŠIĆ-DRINKOVIĆ,
JASNA ČEPIN BOGOVIĆ, VERA KATALINIĆ-JANKOVIĆ*

Deskriptori: Latentna tuberkuloza – dijagnoza, farmakoterapija; Tuberkulinski test; Test oslobađanja interferona gama: antituberkulotici – terapijska primjena; Rifampicin – terapijska primjena; Isoniazid – terapijska primjena

Sažetak. S obzirom na to da su osobe s latentnom tuberkuloznom infekcijom (LTBI) rezervoar budućih bolesnika, na putu prema eradikaciji tuberkuloze (TBC) nije dovoljno samo liječiti bolesnike koji boluju od aktivnog TBC-a, nego je nužno tražiti, dijagnosticirati i liječiti osobe s LTBI. Osnovni cilj bio je procijeniti dijagnostičku vrijednost *ex vivo* određivanja koncentracije IFN- γ u djece s pojačanom reakcijom nakon redovitog PPD-testiranja. U istraživanje je uključeno 120-ero BCG-irane djece. Petnaest-ero (12,5%) djece imalo je pozitivan QFT-GIT, a 105-ero (87,5%) negativan QFT-GIT. Nije bilo statistički značajne razlike u veličini PPD-probe između skupina (21,5 mm u QFT+, 20,9 mm u QFT- skupini, $p = 0,458$). Postojala je razlika u skupinama u odnosu prema koncentraciji IFN- γ nakon stimulacije antigenima specifičnima za *M. tuberculosis*, dok nije bilo razlike ni u bazičnoj koncentraciji IFN- γ , a ni u koncentraciji IFN- γ nakon stimulacije mitogenom fitohemaglutininom. Nakon provedene kemoprofilakse QFT-GIT je ostao pozitivan u dvoje djece ($p = 0,019$). Zaključno, u složenom postupku dijagnosticiranja LTBI određivanje koncentracije IFN- γ može biti ključno u donošenju odluke hoće li se kod određenog djeteta primijeniti preventivna terapija.

Descriptors: Latent tuberculosis – diagnosis, drug therapy; Tuberculin test; Interferon-gamma release tests; Antitubercular agents – therapeutic use; Rifampin – therapeutic use; Isoniazid – therapeutic use

Summary. Since persons with latent tuberculosis infection (LTBI) represent a huge reservoir of potential tuberculosis (TB) disease, accurate diagnosis and treatment of LTBI is essential for TB control and eradication. The aim was to assess the diagnostic value of determination of interferon-gamma release assay in school children with hyperreactive tuberculin skin test (TST) reaction. A total of 120 BCG-vaccinated children were investigated due to a hyperreactive TST results. The QuantiFERON-TB Gold In-Tube test (QFT-GIT) was performed. Fifteen children (12.5%) had positive QFT-GIT and 105 (87.5%) children had negative QFT-GIT. There was no statistically significant difference in TST reaction (21.5 mm u QFT+ vs. 20.9 mm u QFT- group, $p=0.458$). The children with positive QFT-GIT had a statistically higher level of interferon-gamma (IFN- γ) than children with negative QFT-GIT. There were no statistically significant differences in concentrations of IFN- γ either basic or upon stimulation with mitogen phytohemagglutinin. After isoniazid prophylaxis QFT-GIT remained positive in two children ($p=0.019$). In a difficult procedure for diagnosing LTBI in BCG-vaccinated children determination of IFN- γ could be the key factor in making decision whether to use preventive therapy or not.

Liječ Vjesn 2015;137:241–245

Tuberkuloza je i nadalje jedan od glavnih javnozdravnih problema u cijelom svijetu. Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) trećina svjetskog stanovništva inficirana je s *Mycobacterium (M.) tuberculosis*, većinom kao latentna tuberkulozna infekcija (LTBI, od engl. *Latent Tuberculosis Infection*).¹ Pod LTBI razumijevamo stanje prisutnoga specifičnog stanično posredovanog imunosnog odgovora koje nastaje nakon infekcije s *M. tuberculosis*. Kod ovog stanja ne postoje klinički znakovi bolesti i nije moguće dokazati *M. tuberculosis* u kulturi.² Osobe s LTBI, iako nemaju aktivnu bolest i nisu zarazne za okolinu, imaju povećan rizik od razvoja aktivne tuberkuloze (TBC).³ To se najčešće događa u prve dvije godine nakon infekcije.⁴ Kod djece je vjerojatnost aktivacije veća nego kod odraslih.⁵ Opsežna epidemiološka istraživanja provedena u razvijenim zemljama s niskom incidencijom tuberkuloze pokazala su da je većina novooboljelih posljedica aktivacije LTBI, a ne recentne infekcije.⁶ S obzirom na to da

su osobe s LTBI rezervoar budućih bolesnika, na putu prema eradikaciji TBC-a nije dovoljno samo liječiti bolesnike s aktivnim TBC-om, nego je nužno tražiti, dijagnosticirati i liječiti osobe s LTBI. Među djecom je potrebno aktivno tražiti inficirane u tri skupine: djeca koja su bila u kontaktu s osobom oboljelom od aktivnog TBC-a, djeca koja su tuberkulinski hiperreaktori otkriveni redovitim testiranjem PPD kožnim testom (PPD, purificirani proteinski derivat)

* **Klinika za dječje bolesti Zagreb** (dr. sc. Ivan Pavić, dr. med.; Jasna Čepin Bogović, dr. med.), **Klinika za dječje bolesti Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu** (dr. sc. Iva Hojsak, dr. med.), **Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb** (dr. sc. Ljiljana Žmak, dr. med.; prim. dr. sc. Vera Katalinić-Janković, dr. med.), **Klinika za pedijatriju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb** (prof. dr. sc. Dorian Tješić-Drinković, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Ivan Pavić, dr. med., Klinika za dječje bolesti Zagreb, Klaićeva 16, 10000 Zagreb, e-mail: ipavic01@gmail.com
Prilježeno 7. lipnja 2014., prihvaćeno 12. svibnja 2015.

predviđenim obveznim kalendarom cijepljenja te djeca kandidati za terapiju anti-TNF- α -protutijelima (infliksimab, adalimumab) ili fuzijskim proteinima IgG/TNF- α -receptora (etanercept). Naime, zbog uloge TNF- α u aktivaciji i sazrijevanju makrofaga moguće je da tijekom primjene terapije anti-TNF- α dođe do aktivacije LTBI.^{7,8} Glavni nedostatak u dijagnostici LTBI je nepostojanje zlatnog standarda. Doneavno PPD test bio je jedini komercijalno dostupan imunološki test za dijagnozu tuberkulozne infekcije s poznatim ograničenjima u njegovoj primjeni.⁹ Naime, PPD je povezan s brojnim interferirajućim čimbenicima koji uzrokuju lažno pozitivne ili lažno negativne rezultate, čime se znatno smanjuju osjetljivost i specifičnost testa.¹⁰ No, upravo su nova otkrića na području imunologije tuberkulozne infekcije pridonijela razvoju novih dijagnostičkih testova oslobađanja interferona gama (IGRA, od engl. *interferon gamma release assay*), kojima se s većom pouzdanosti može dijagnosticirati LTBI. Radi se o *ex vivo* testovima, kojima se kod osoba inficiranih s *M. tuberculosis* potiče oslobađanje IFN- γ iz limfocita T nakon inkubacije s antigenima specifičnim za *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10 i TB7.7) kojima se razlikuje od većine preostalih mikobakterija.¹¹ S obzirom na to da specifični antigeni iz IGRA-testova nisu prisutni ni u jednom BCG-soju (BCG, od *Bacillus Calmette-Guérin*), ni u većine netuberkuloznih mikobakterija (NTM), mogućnost pojave lažno pozitivnih rezultata svedena je na najmanju moguću mjeru.¹² Trenutačno na tržištu postoje dva komercijalno dostupna testa, *QuantiFERON-TB Gold In Tube* (QFT-GIT) (Cellestis Ltd, Carnegie, Australija) i *T-SPOT.TB* (Oxford Immunotec, Abingdon, Velika Britanija) od kojih je QFT-GIT-test registriran i upotrebljava se u Hrvatskoj.

Budući da su u literaturi podaci o imunosnom odgovoru na infekciju s *M. tuberculosis* oskudni, istražili smo vrijednost *ex vivo* određivanja koncentracije IFN- γ u djece s pojačanom reakcijom nakon redovitog PPD-testiranja. Osnovni cilj ovog istraživanja bio je odrediti koliki broj PPD-hiperreaktora zaista ima LTBI potvrđenu osjetljivijim i specifičnijim IGRA-testom. Nadalje, željeli smo odrediti koliki broj djece PPD-hiperreaktora neće biti podvrgnut nepotrebnoj kemoprofilaksi ako se u algoritam testiranja uključi i IGRA-test.

Ispitanici i metode

U ispitivanje su uključena djeca sedmog razreda osnovne škole, koja su zbog pojačane reakcije nakon rutinskog PPD-testiranja u razdoblju od rujna 2011. do lipnja 2013. godine bila upućena u Kliniku za dječje bolesti Zagreb radi ispitivanja moguće infekcije s *M. tuberculosis*. Sva su djeca u rodilištu primila BCG-cjepivo (atenuirano cjepivo SSI-0,0375 mg *M. bovis*, *Danish strain* 1331). Iz ispitivanja su isključena imunokompromitirana djeca te djeca s aktivnom tuberkulozom.

U ispitivanom razdoblju u našoj ustanovi pregledano je 120-ero djece PPD-hiperreaktora. Prema rezultatima GFT-GIT-a ispitanici su svrstani u dvije skupine:

- Skupina I – djeca s pozitivnim nalazom QFT-GIT (N = 15) te
- Skupina II – djeca s negativnim nalazom QFT-GIT (N = 105).

Tuberkulinski kožni test proveden je s 2 jedinice standardizirane otopine PPD-a (Tuberkulin PPD RT23, Statens Serum Institute, Copenhagen, Danska) prema Mantouxovoj metodi, a veličina induracije očitavala se nakon 72 sata. Prema Napatku za suzbijanje i sprečavanje tuberkuloze kao

hiperreaktori su označeni oni kojima je poprečni promjer induracije >15 mm.¹³

Za određivanje koncentracije IFN- γ uzorkovan je po 1 mL krvi u tri epruvete koje sadržavaju: specifične antigene mikobakterija tuberkuloze (ESAT-6, CFP10 i TB7.7), heparin (negativna kontrola) i mitogenik fitohemaglutinin (pozitivna kontrola). Koncentracija IFN- γ određivana je metodom ELISA, s pomoću posljednje generacije komercijalnog testa QuantiFERON-TB Gold In Tube (Cellestis Ltd., Carnegie, Australija) prema uputama proizvođača. Rezultati se tumače na temelju granične vrijednosti od 0,35 IU/mL. Vrijednosti $\geq 0,35$ IU/mL (pozitivan nalaz) upućuju na infekciju s *M. tuberculosis*, ali ne razlikuju bolest od latentne infekcije. Vrijednosti manje od 0,35 IU/mL (negativan nalaz) upućuju na to da je infekcija s *M. tuberculosis* malo vjerojatna. Treća je mogućnost dobivanje neodredivog rezultata, koji se dobije kada je koncentracija IFN- γ u cirkulaciji povišena (negativna kontrola > 8 kU/L) te kad je nedovoljan broj limfocita T, odnosno kad je narušena njihova sposobnost da otpuštaju IFN- γ na poticaj (pozitivna kontrola < 0,5 kU/L). U slučaju pozitivnog nalaza provedena je kemoprofilaksa te je IGRA-testiranje ponovljeno nakon završetka kemoprofilakse.

Etičko povjerenstvo Klinike za dječje bolesti odobrilo je istraživanje. U studiju su uključena djeca čiji su informirani roditelji potpisali pristanak. Dijagnostički postupci su provedeni u skladu s Deklaracijom za ljudska prava iz Helsinkija 1975. godine i Seuskim nadopunama iz 2008.¹⁴

Statistika

Primjenom Smirnov-Kolmogorovljeva testa analizirana je distribucija podataka. Razlike u distribuciji kvalitativnih varijabla utvrđene su χ^2 -testom, dok su se za razlike kvantitativnih varijabla, s obzirom na distribuciju, rabili parametrijski t-test ili neparametrijski Mann-Whitneyjev U-test. Binarnom logističkom regresijom odredili smo značajne prediktore za pozitivan QFT-GIT. Regresijski model uključio je: spol, broj leukocita, limfocita, trombocita i sedimentacija. Sve su statističke analize dvosmjerne, a razina značajnosti od 5% smatrala se značajnom. Za statističke analize rabili smo statistički *software* SPSS.

Rezultati

U istraživanje je uključeno ukupno 120-ero djece, od kojih je 15-ero imalo pozitivan QFT-GIT (skupina QFT+), a 105 negativan QFT-GIT (skupina QFT-). U skupini QFT+ omjer dječaka/djevojčica bio je 10/5, a u skupini QFT- 43/62 (p = 0,061). Nije bilo statistički značajne razlike u veličini PPD-probe između skupina (srednja vrijednost 21,5 mm u QFT+ prema 20,9 mm u QFT- skupini, p = 0,458). Sva su djeca imala uredan rentgenogram torakalnih organa. Određivanjem koncentracije IFN- γ u plazmi bez stimulacije limfocita mitogenikom određena je njegova bazična koncentracija, a određivanjem IFN- γ u plazmi nakon stimulacije mitogenikom PHA ispitana je sposobnost limfocita T da na poticaj ovim mitogenikom izlučuju IFN- γ . Razlike u skupinama u odnosu prema bazičnoj koncentraciji IFN- γ (Nil), koncentraciju IFN- γ nakon stimulacije antigenima specifičnim za *M. tuberculosis* (TB-Ag) i koncentraciji IFN- γ nakon stimulacije mitogenikom PHA (Mitogen) prikazane su u tablici 1. Nije nađena statistički značajna razlika u skupinama u odnosu prema bazičnoj koncentraciji IFN- γ (p = 0,176) i koncentraciji IFN- γ nakon stimulacije mitogenikom PHA (p = 0,728). Razlika u koncentraciji IFN- γ

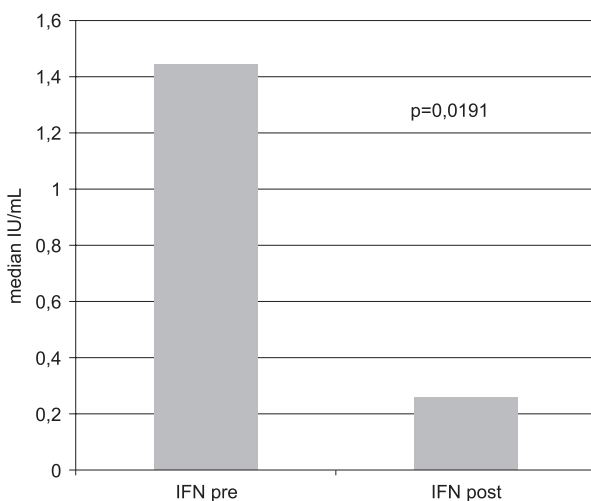
Tablica 1. Razlike između skupina QFT+ i QFT-
Table 1. The differences between QFT+ and QFT- groups

	Skupina QFT+ Group QFT+ N=15	Skupina QFT- Group QFT- N=105	P
Nula, medijan (raspon) /Nil, median (range)	0,06 (0 do 0,88)	0,05 (0 do 2)	0,176
TB-Ag, medijan (raspon) /TB-Ag, median (range)	1,64 (0,3 do 10)	0,07 (0 do 2)	<0,001
Mitogen, medijan (raspon) /Mitogen, median (range)	10 (10 do 16)	10 (0,82 do 34)	0,736
TB-Ag-Nula, medijan (raspon) /TB-Ag-Nil, median (range)	1,27 (-0,1 do 10)	0 (-2 do 0,34)	<0,001
Mitogen-Nula, medijan (raspon) /Mitogen-Nil, median (range)	10 (10 do 16)	10 (0,69 do 33)	0,728

Tablica 2. Binarna logistička regresija. Rizični čimbenici za pozitivnost QFT-GIT

Table 2. Binar logistic regression. Risk factors for positive results of QFT-GIT

	Omjer izgleda (OR) Odds ratio (OR)	95%-tni interval pouzdanosti 95% confidence interval	P
Spol/Gender	0,439	0,131 – 1,471	0,182
Sedimentacija /Sedimentation rate	0,985	0,846 – 1,146	0,842
Broj leukocita /Leukocyte count	0,779	0,460 – 1,318	0,352
Broj limfocita /Lymphocyte count	1,035	0,950 – 1,128	0,427
Broj trombocita /Platelet count	1,0	0,988 – 1,011	0,944



Slika 1. Promjene razine interferona gama određene QuantiFERON-TB Gold In-Tube testom nakon provedene profilakse isoniazidom

Figure 1. Changes of interferon-gamma levels in QuantiFERON-TB Gold In-Tube tests after isoniazid prophylaxis

nakon stimulacije mitogenikom bila je statistički značajna ($p < 0,001$). Nijedno dijete nije imalo bazičnu koncentraciju IFN- γ višu od 8,0 IU/mL, što navodi na zaključak da u ispitivane djece nije bilo nespecifične stimulacije otpuštanja IFN- γ iz limfocita T. Nakon stimulacije mitogenikom PHA

nije bilo djece s koncentracijom IFN- γ nižom od 0,5 IU/L, što znači da su limfociti T u svih ispitanika imali sposobnost izlučivanja IFN- γ na adekvatan poticaj antigenom.

Binarnom logističkom regresijom nije nađena statistički značajna korelacija između statusa QFT-a i upalnih parametara (leukociti, limfociti, sedimentacija, trombociti) te spola (tablica 2).

U skupini QFT+ provedena je kemoprofilaksa LTBI izoniazidom tijekom šest mjeseci svakodnevno u dozi od 5 mg/kg te su IGRA-testovi ponovljeni nakon završene kemoprofilakse. Od ukupno 15-ero djece s inicijalno pozitivnim QFT-GIT-om kontrolni su podaci bili dostupni za njih osmero. Nakon provedene kemoprofilakse IGRA-test se negativizirao kod šestoro djece, dok je kod dvoje ostao pozitivan (2/8, 25%, $p = 0,019$) (slika 1.).

Rasprava i zaključci

Analiza rezultata ovog istraživanja potvrdila je hipotezu da određivanje koncentracije IFN- γ može pridonijeti preciznijoj dijagnostici LTBI u djece s hiperreaktivnim nalazom PPD-a. To znači da djeca s PPD-pozitivnom/QFT-GIT-pozitivnom sukladnošću najvjerojatnije imaju LTBI i trebaju dobiti odgovarajuću kemoprofilaksu. Temeljem negativnog nalaza QFT-GIT-testa dijagnoza LTBI može se vjerojatno isključiti. U potonjem slučaju PPD-pozitivne/QFT-GIT-negativne nesukladnosti postoji velika vjerojatnost da je PPD lažno pozitivan zbog njegove niske specifičnosti u djece koja su primila BCG-cjepivo ili kao posljedica infekcije NTM-om. No, ako u navedenom slučaju PPD-pozitivne/QFT-GIT-negativne nesukladnosti postoje anamnestički podatci o infektivnim čimbenicima rizika visoko suspektivna za moguću infekciju, preporuka je da se nakon određenog vremena (8–10 tjedana) IGRA-test ponovi.¹⁵ Tako će se razlučiti je li pozitivan PPD posljedica infekcije s *M. tuberculosis* u slučaju dobivanja pozitivnog IGRA-testa ili lažno pozitivne reakcije u slučaju dobivanja negativnog IGRA-testa.

Svaki dijagnostički postupak zahtijeva kvalitetnu interpretaciju i korelaciju rezultata s anamnestičkim podatcima i kliničkim nalazima. Idealan bi test bio onaj za koji postoje pouzdane granične vrijednosti temeljem kojih bi se bolesnici mogli razlikovati od zdravih, ali idealnog testa nema. Dijagnostička vrijednost PPD-a ovisi o graničnim vrijednostima koje razdvajaju pozitivne od negativnih rezultata, a granična vrijednost ovisi o tome radi li se o populaciji koja je BCG-irana, o križnoj reaktivnosti s NTM-om i imunosupresivnim stanjima.^{16–18} Istraživanja primjene IGRA-testova za dijagnozu LTBI u djece pokazala su da IGRA-testovi imaju prednost pred PPD-om zbog više specifičnosti, odlične negativne prediktivne vrijednosti, dobre korelacije sa stupnjem izloženosti i vjerojatno su prvi izbor u BCG-irane djece te su na taj način korisni u reduciranju preventivne profilaktičke terapije zbog mogućih lažno pozitivnih rezultata PPD-a.^{19–21} Glavni problem u dijagnostici LTBI jest nepostojanje zlatnog standarda za postavljanje dijagnoze, jedino je sigurna mogućnost aktivacije i razvoja aktivnog TBC-a. Zbog toga se za određivanje specifičnosti testova koji se rabe u dijagnostici LTBI uzimaju zdrave osobe, niskog rizika, bez poznate izloženosti tuberkuloznim bolesnicima, dok se za određivanje osjetljivosti uzimaju dva surrogata infekcije, i to mikrobiološki potvrđeni bolesnici s aktivnom tuberkulozom i poznata izloženost tuberkuloznom bolesniku.²²

Prema rezultatima istraživanja provedenog u djece školske dobi djeci s PPD-pozitivnom/IGRA-negativnom nesukladnošću ne bi se trebala preporučiti profilaktička tera-

pija.²³ Naime, unatoč činjenici da u toj studiji ni jedno dijete s PPD-pozitivnom/IGRA-negativnom nesukladnošću nije uzimalo profilaktičku terapiju, u prospektivnom praćenju od 3,5 godina ni u jednog od njih nije se razvio aktivni TBC. U skladu s rezultatima navedenog istraživanja jest i preporuka Nacionalnog instituta za zdravlje i kliničku izvrsnost (NICE, od engl. *UK National Institute for Health and Clinical Excellence*) iz 2010. godine da se djeci >5 godina s TST-pozitivnom/IGRA-negativnom nesukladnošću ne preporučuje profilaktička terapija.²⁴

Istraživanje Diel i sur. o prediktivnoj vrijednosti IGRA-testova za razvoj aktivnog TBC-a koje je uključivalo 106-ero djece s poznatim bliskim TBC-kontaktom pokazalo je da je negativna prediktivna vrijednost IGRA-testova 100%, jer se ni u jednog djeteta s negativnim IGRA-testom kojemu nije bila ponuđena profilaktička terapija nije razvila aktivna tuberkuloza tijekom praćenja od 3 godine i 7 mjeseci.²⁵ Isto je istraživanje potvrdilo odranije poznatu činjenicu da je rizik od razvoja aktivne bolesti nakon akutne infekcije u djece znatno veći nego u odraslih, jer je 28,6% djece u usporedbi s 10,3% odraslih s pozitivnim IGRA-testom koji su odbili profilaktičku terapiju, tijekom prospektivnog praćenja oboljelo do aktivnog TBC-a.

Prema rezultatima našeg istraživanja, moglo bi se reći da je dijagnoza LTBI potvrđena u 12,5% djece temeljem pozitivne sukladnosti PPD/QFT-GIT-testova, dok je dijagnoza LTBI vjerojatno isključena u 87,5% djece temeljem PPD-pozitivne/QFT-GIT-negativne nesukladnosti. Kemoprofilaksa LTBI provedena je samo u djece s pozitivnim nalazom QFT-GIT-testa, čime je izbjegnuta nepotrebna kemoprofilaksa temeljem samoga hiperreaktivnog nalaza PPD-testa. Prema hrvatskom Naputku za suzbijanje i sprečavanje tuberkuloze liječenje LTBI u djece provodi se izoniazidom tijekom 6 mjeseci, svakodnevno u dozi od 5 mg/kg.¹³ Poznato je da lijekovi koji se rabe za kemoprofilaksu LTBI mogu imati neželjene nuspojave od kojih je najčešća pojava i progresija patoloških nalaza funkcije jetre, što znatno može utjecati na pridržavanje režima preporučene kemoprofilakse. Utvrđeno je da dulje trajanje primjene lijeka smanjuje suradljivost u adekvatnom provođenju preporučene kemoprofilakse, što smanjuje njezinu djelotvornost.^{26,27} Radi poboljšanja suradljivosti pacijenata i učinkovitosti kemoprofilakse razvijaju se kraće terapijske sheme (tablica 3.),²⁷ ali se kod nas još ne preporučuju u djece s LTBI. Pretpostavljajući da IGRA-testovi preciznije dijagnosticiraju LTBI, mogli bismo zaključiti da određivanje koncentracije IFN- γ u djece s pozitivnim nalazom PPD-a znatno reducira nepotrebnu primjenu kemoprofilakse. Tijekom provođenja i

nakon završetka kemoprofilakse te u slučajevima kada terapija nije uvedena potrebna su daljnja praćenja i kontrole djece u minimalnom razdoblju od dvije godine.

QFT-GIT-testom određuje se koncentracija IFN- γ oslobođena iz limfocita T nakon stimulacije antigenima visoko specifičnim za *M. tuberculosis*, koji ga razlikuju od većine drugih mikobakterija. Poznavajući činjenicu da *M. tuberculosis* dijeli neke zajedničke antigene s netuberkuloznim mikobakterijama *M. flavescens*, *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. marinum* i *M. szulgai*, moguće je da infekcija nekom od navedenih netuberkuloznih mikobakterija dovede do pozitivnih (lažno pozitivnih) rezultata QFT-GIT-testa.²⁸ Uzimajući u obzir rezultate recentnog epidemiološkog istraživanja koje je pokazalo da u našoj državi nije izolirana nijedna od navedenih netuberkuloznih mikobakterija u dječjoj dobi, vjerojatno možemo pretpostaviti da nitko od naših ispitanika nije imao lažno pozitivan rezultat QFT-GIT-testa uzrokovan infekcijom nekom od NTM.²⁹ Neodređivi i lažno negativni rezultati QFT-GIT-testa mogu upozoriti na imunokompromitiranog bolesnika ili pogreške u prikupljanju i postupanju s uzorcima krvi.³⁰ Upravo je mogućnost primjene pozitivne i negativne kontrole velika prednost IGRA-testova u odnosu prema PPD-u. Naime, rabeći mitogenik PHA kao pozitivnu kontrolu za provjeru imunosnog statusa bolesnika i ispravnosti postupanja s uzorkom, izbjegavamo mogućnost dobivanja lažno negativnog rezultata, dok negativna kontrola bez mitogenika i antigena daje uvid u koncentraciju IFN- γ prisutnu u cirkulaciji neovisno o podražajima *ex vivo* izbjegavajući mogućnost dobivanja lažno pozitivnog rezultata.

Istraživanja primjene IGRA-testova upozorila su na mogućnost pojave neodredivih rezultata, odnosno stanja kada nije moguće odrediti status infekcije s *M. tuberculosis*. Neodrediv rezultat dobije se kada je koncentracija IFN- γ u cirkulaciji povišena (negativna kontrola > 8 IU/L), kada je nedovoljan broj limfocita T i/ili je smanjena njihova sposobnost da otpuštaju IFN- γ (pozitivna kontrola < 0,5 IU/L). U našem istraživanju određivanje koncentracije IFN- γ nije rezultiralo nijednim neodredivim rezultatom, što je najvjerojatnije posljedica zdrave populacije naših ispitanika te standardizacije preanalitičkih i analitičkih postupaka. Velike su varijacije udjela neodredivih rezultata među pojedinim istraživanjima i kreću se u rasponu od 0 do 16%.³¹ Prema rezultatima Topić-Zrinski i sur., najčešći razlozi za njihovu pojavnost jesu tehničke pogreške prilikom uzorkovanja i postupanja s uzorcima, a od kliničkih stanja određivanje IGRA-testa u tijeku akutne upale.³² No, i druga klinička stanja i kod djece i kod odraslih mogu dovesti do pojave neodredivih rezultata. Tu spadaju: transplantacija organa, primjena imunosupresivnih lijekova, maligne bolesti, primarne imunodeficijencije, akutna tuberkuloza, pneumonija, limfocitopenija (posebice smanjen broj CD4⁺ stanica), atopija i primjena β -laktamskih antibiotika.³³⁻³⁵ U slučaju dobivanja neodredivog rezultata IGRA-testa preporučuje se ponoviti ga, a ponovno dobivanje neodredivog rezultata iziskuje detaljnu dijagnostičku obradu kojom bi se utvrdio mogući uzrok bilo snižene koncentracije IFN- γ nakon stimulacije mitogenikom PHA, bilo povišene koncentracije IFN- γ u negativnoj kontroli.

Nedostatni su podatci o dinamici koncentracije IFN- γ za vrijeme LTBI i kod djece i kod odraslih. Serijsko određivanje koncentracije IFN- γ otkrilo je četiri moguća fenotipa: perzistentno pozitivni, perzistentno negativni, stabilni konverteri (osobe koje postaju pozitivne i zadržavaju pozitivnost određeno vrijeme) i nestabilni konverteri (osobe koje se negativiziraju nakon nekog vremena).³⁶ Za sada nije poz-

Tablica 3. Terapijske sheme liječenja LTBI²⁷
Table 3. Summary of LTBI regimens²⁷

Terapija/Therapy	Djelotvornost (u usporedbi s placebom) /Efficacy (relative to placebo)
izoniazid 6 mj./isoniazid 6 mo	69%
rifampicin 4 mj./rifampins 4 mo	65%
izoniazid 9 mj.*/isoniazid 9 mo*	90%
izoniazid 12 mj.*/isoniazid 12 mo*	93%
izoniazid i rifampicin 3 mj.*/isoniazid and rifampins 3 mo*	69%
rifampicin i pirazinamid 2 mj.*/rifampins and pyrazinamide 2 mo*	90-93%

* – Navedene terapijske sheme nisu u skladu s Nacionalnim nuputkom za suzbijanje i sprečavanje tuberkuloze. / These LTBI regimens are not in line with National instructions for the control and prevention of tuberculosis.

nato kakva je prognostička vrijednost pojedinog od navedenih fenotipova, a od budućih istraživanja očekuje se da se navedeno potpuno razluči. Pretpostavljajući da bi se serijskim određivanjem koncentracije IFN- γ mogao procijeniti uspjeh terapije, kod svojih smo ispitanika s pozitivnim QFT-GIT-testom nakon provedene profilakse ponovili test. Iako je većina djece imala negativan nalaz QFT-GIT-testa, činjenica da je njih dvoje imalo pozitivan test upućuje na zaključak da ovi testovi nisu pogodni za praćenje uspjeha terapije te da treba tragati za novim biljezima kojima će se pouzdanije procijeniti uspješnost provedene terapije. Navedeni je zaključak u skladu s rezultatima drugih istraživanja koja su pokazala da velik udio djece nakon provedene terapije LTBI i aktivnog TBC-a i nadalje ima pozitivan rezultat IGRA-testa.³⁷⁻³⁹

Zaključno, u složenom postupku dijagnosticiranja LTBI određivanje koncentracije IFN- γ može biti ključno u donošenju odluke hoće li se kod određenog djeteta primijeniti preventivna terapija, no nije dostatno za procjenu uspjeha provedene terapije. Podatci o rezultatima IGRA-testova, i to ne samo iz kliničkih istraživanja nego i iz naše svakodnevne kliničke prakse, pridonijet će poboljšanju zdravstvene skrbi za djecu i pomoći u donošenju preporuka o primjeni IGRA-testova u dječjoj dobi, a sve s ciljem što točnije dijagnoze LTBI i njezina liječenja te u konačnici potpune eradikacije tuberkuloze.

LITERATURA

1. *World Health Organisation*. Global tuberculosis control 2013. Geneva: World Health Organisation; 2013.
2. Pavić I. Latentna tuberkulozna infekcija. *Paediatr Croat* 2014;58(Suppl 1):47-53.
3. Jurčev Savičević A. Epidemiološke osobitosti tuberkuloze u dječjoj dobi. *Paediatr Croat* 2014;58(Suppl 1):40-6.
4. Aberle N. Tuberkuloza u djece – suvremene spoznaje. *Medix* 2012; 101/102:249-54.
5. Piccini P, Chiappini E, Tortoli E, de Martino M, Galli L. Clinical peculiarities of tuberculosis. *BMC Infect Dis* 2014;14(Suppl 1):S4.
6. Horsburgh CR and Rubin EJ. Clinical practice. Latent tuberculosis infection in the United States. *N Engl J Med* 2011;364:1441-8.
7. Salgado E, Gómez-Reino JJ. The risk of tuberculosis in patients treated with TNF antagonists. *Expert Rev Clin Immunol* 2011;7:329-40.
8. Woodrick RS, Ruderman EM. Safety of biologic therapy in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7:639-52.
9. 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.
10. Jurčev-Savičević A, Katalinić-Janković V, Miše K, Gudelj I. The role of Interferon-gamma release assay in tuberculosis control. *Arh Hig Rada Toksikol* 2012;63:49-59.
11. Majić Milotić D, Popović-Grle S, Katalinić-Janković V, Šimunović A. Usporedba nove i stare dijagnostike latentne tuberkulozne infekcije (QuantiFERON i PPD). *Liječ Vjesn* 2011;133:396-402.
12. Pavić I, Dodig S, Zrinski Topić R, Raos M. Interferon gamma release assay in a 12-months-old BCG-vaccinated infant with latent tuberculosis infection and isolated *M. fortuitum*. *Lab Med* 2010;41:5-7.
13. *Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi, Hrvatski zavod za javno zdravstvo*. Napatuk za suzbijanje i sprečavanje tuberkuloze. 2. izd. Zagreb: Uvez d. o. o.; 2010, str. 60-77.
14. *World Medical Association Declaration of Helsinki*. Principles for medical research involving human subjects. *World Med J* 2008;54: 122-5.
15. *Centers for Disease Control and Prevention*. Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection. *United States*. *MMWR* 2010;59(RR05):1-25.
16. Leung CC. Screening contacts of tuberculosis overcoming obstacles with an old tool. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:939-40.
17. Tissot F, Zannetti G, Francioli P, Zellweger JP, Zysset F. Influence of bacille Calmette-Guérin vaccination on size of tuberculin skin test reaction: to what size? *Clin Infect Dis* 2005;40:211-7.
18. *American Thoracic Society*. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 1161:376-95.
19. Diel R, Goletti D, Ferrara G i sur. Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2011;37:88-99.
20. Pavić I, Zrinski Topić R, Raos M, Aberle N, Dodig S. Interferon- γ release assay for the diagnosis of latent tuberculosis in children younger than 5 years of age. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30:866-70.
21. Altet-Gómez N, De Souza-Galvao M, Latorre I i sur. Diagnosing TB infection in children: analysis of discordances using in vitro tests and tuberculin skin test. *Eur Respir J* 2011;37:1166-74.
22. Lalvani A, Pareek M. A 100 year update on diagnosis of tuberculosis infection. *Br Med Bull* 2010;93:69-84.
23. Higuchi K, Harada N, Mori T i sur. Use of QuantiFERON-TB Gold to investigate tuberculosis contacts in a high school. *Respirology* 2007; 12:88-92.
24. *National Collaborating Centre for Chronic Conditions*. Tuberculosis: Clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. London: Royal College of Physicians; 2010.
25. Diel R, Lodenkemper R, Niemann S, Meywald-Walter K, Nienhaus A. Negative and positive predictive value of a whole-blood IGRA for developing active TB-an update. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183: 88-95.
26. Horsburgh CR Jr, Goldberg S, Bethel J i sur. Latent TB infection treatment acceptance and completion in the United States and Canada. *Chest* 2010;137:401-9.
27. Menzies D, Al Jahdali H, Al Otaibi B. Recent developments in treatment of latent tuberculosis infection. *Ind J Med Res* 2011;133: 257-66.
28. *Clinical Experience with QuantiFERON-TB Gold (In-Tube)*. Dostupno na: <http://www.cellestis.com>. Pristupljeno: 13. veljače 2014.
29. van der Werf MJ, Ködmön S, Katalinić-Janković V i sur. Inventory study of non-tuberculous mycobacteria in the European Union. *BMC Infect Dis* 2014;14:62.
30. Zrinski Topić R. Latent tuberculosis infection. *Rad HAZU* 2012;37: 9-18.
31. Pavić I, Čepin Bogović J. Test oslobađanja interferona gama u dijagnostici latentne tuberkulozne infekcije u djece. U: Pavlov N, Čulić S, Miše K, ur. *Prevenција i liječenje infekcija dišnog sustava*. Split: KBC Split; 2013, str. 301-9.
32. Zrinski Topić R, Zoričić-Letoja I, Pavić I, Dodig S. Indeterminate results of QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay in nonimmunosuppressed children. *Arch Med Res* 2011;42:138-43.
33. Kobashi Y, Sugiu T, Mouri K, Obase Y, Miyashita N, Oka M. Indeterminate results of QuantiFERON TB-2G test performed in routine clinical practice. *Eur Respir J* 2009;33:812-5.
34. Hausteiner T, Ridout DA, Hartley JC i sur. The likelihood of an indeterminate test result from a whole-blood interferon- γ release assay for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in children correlates with age and immune status. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28: 669-73.
35. Pavić I, Tješić Drinković D, Čepin Bogović J, Dodig S. Neodrediv rezultata testa oslobađanja interferona gama u dječjoj dobi – pregled literature s prikazom bolesnika. *Paediatr Croat* 2014;58:40-6.
36. Pai M. Spectrum of latent tuberculosis-existing tests cannot resolve the underlying phenotypes. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:242-3.
37. Nenadić N, Kristić Kirin B, Zoričić Letoja I, Plavec D, Zrinski Topić R, Dodig S. Serial Interferon- γ release assay in children with latent tuberculosis infection and children with tuberculosis. *Pediatr Pulmonol* 2011;47:401-8.
38. Lee SH, Lew WJ, Kim JH i sur. Serial interferon-gamma release assays after rifampicin prophylaxis in a tuberculosis outbreak. *Respir Med* 2010;104:448-53.
39. Dyrholm-Riise AM, Gran G, Wentzel-Larsen T, Blomberg B, Haanshuus CG, Mørkve O. Diagnosis and follow-up of treatment of latent tuberculosis; the utility of the QuantiFERON-TB Gold In-tube assay in outpatients from a tuberculosis low-endemic country. *BMC Infect Dis* 2010;10:57.