

# Dijagnostička vrijednost interferona gama iz limfocita djece mlađe od pet godina s latentnom tuberkuloznom infekcijom

---

**Pavić, Ivan**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2013**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:741158>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-20**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





## Središnja medicinska knjižnica

**Pavić, Ivan (2013) *Dijagnostička vrijednost interferona gama iz limfocita djece mlađe od pet godina s latentnom tuberkuloznom infekcijom [Diagnostic value of interferon gamma from lymphocytes of children under five years with latent tuberculosis infection].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/1887>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Pavić

DIJAGNOSTIČKA VRIJEDNOST INTERFERONA GAMA IZ  
LIMFOCITA DJECE MLAĐE OD PET GODINA  
S LATENTNOM TUBERKULOZNOM INFEKCIJOM

DISERTACIJA

Zagreb, 2013.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za pulmologiju, alergologiju, imunologiju i reumatologiju  
Klinike za dječje bolesti u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Nede Aberle i prof. dr. sc.  
Slavice Dodig.

Zahvaljujem svima koji su mi pomogli pri izradi disertacije:

- Prof. dr. sc. Slavici Dodig i prof. dr. sc. Nedi Aberle, svojim mentoricama na doktorskoj disertaciji, koje su me od početka poticale, te vrijednim savjetima uz puno volje i vremena nesebično educirale i pomagale u izradi ovog rada.
- Voditeljici Zavoda dr. Jasni Čepin-Bogović, koja mi nesebično pomaže u edukaciji i svakodnevnom radu, te me usmjerava, motivira i potiče od samih početaka, a samo vrle ljude krasi nesebičnost.
- Prim. mr. sc. Miljenku Raosu, svom prijatelju i kolegi, čiji su korisni savjeti i kritike pomogli u izradi ovog rada.
- Renati Petrović, dipl. ing., koja je posvetila svoje dragocjeno vrijeme u obradi podataka.
- Mojoj obitelji, koja me svakodnevno obasipala nadom i razmijevanjem.

## SADRŽAJ RADA

1. UVOD .....	1
1.1. Mikobakterij tuberkuloze .....	6
1.1.1. Opće karakteristike .....	6
1.1.2. Patomehanizam tuberkulozne infekcije .....	7
1.1.3. Polimorfizam gena i tuberkuloza .....	13
1.2. TUBERKULOZA .....	14
1.2.1. Definicija tuberkuloze .....	14
1.2.1.1. Primarna tuberkuloza .....	14
1.2.1.2. Postprimarna tuberkuloza .....	14
1.2.2. Dijagnostika tuberkuloze .....	15
1.2.3. Terapija tuberkuloze .....	19
1.3. LATENTNA TUBERKULOZNA INFEKCIJA .....	20
1.3.1. Definicija latentne tuberkuloze .....	20
1.3.2. Dinamički model latentne tuberkulozne infekcije .....	21
1.3.3. Dijagnostika latentne tuberkulozne infekcije .....	22
1.3.3.1. Tuberkulinski kožni test .....	24
1.3.3.2. Laboratorijska dijagnostika latentne tuberkulozne infekcije .....	25
1.3.4. Liječenje (kemoprofilaksa) latentne tuberkulozne infekcije .....	30
2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA .....	33
2.1. Opći ciljevi .....	33
2.2. Specifični ciljevi .....	33
2.3. Hipoteza .....	34
3. ISPITANICI I METODE .....	35
3.1. Ispitanici .....	35
3.2. Metode .....	36
3.2.1. Metode in vivo .....	36
3.2.1.1. Tuberkulinski kožni test .....	36
3.2.2. Metode ex vivo .....	37
3.2.2.1. Uzorkovanje krvi .....	38
3.2.2.2. Inkubacija leukocita s antigenima .....	39

3.2.2.3. Određivanje interferona gama.....	39
3.2.3. Statističke metode .....	39
4. REZULTATI.....	42
4.1. Tuberkulinski kožni test.....	43
4.2. Određivanje IFN- $\gamma$ .....	44
4.3. Rezultati sukladnosti tuberkulinskog kožnog testa i IFN- $\gamma$ .....	46
4.4. Rezultati u skupini I.....	47
4.4.1. Rezultati tuberkulinskog kožnog testa .....	47
4.4.2. Određivanje IFN- $\gamma$ .....	48
4.4.3. Rezultati sukladnosti tuberkulinskog kožnog testa i IFN- $\gamma$ .....	49
4.5. Rezultati u skupini II.....	50
4.5.1. Rezultati tuberkulinskog kožnog testa .....	51
4.5.2. Određivanje IFN- $\gamma$ .....	52
4.5.3. Rezultati sukladnosti tuberkulinskog kožnog testa i IFN- $\gamma$ .....	53
4.6. Sukladnost između tuberkulinskog kožnog testa i interferona gama.....	55
4.7. Sposobnost otpuštanja IFN- $\gamma$ iz leukocita.....	59
4.7.1. Razlika po spolu.....	62
4.7.2. Koncentracija IFN- $\gamma$ nakon stimulacije s mikobakterijskim antigenima.....	64
4.7.3. Usporedba koncentracije IFN- $\gamma$ prema dobi .....	65
4.7.4. Korelacija između koncentracije IFN- $\gamma$ i dobi djece .....	67
4.7.5. Dijagnostička značajnost određivanja koncentracije IFN- $\gamma$ .....	70
5. RASPRAVA .....	87
6. ZAKLJUČCI.....	101
7. SAŽETAK .....	104
8. SUMMARY .....	106
9. LITERATURA .....	108
10. ŽIVOTOPIS.....	118

## POPIS KRATICA

AIDS – Sindrom stečene imunodeficijencije (eng. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*)

ARB – acidorezistentni bacil

BCG – Bacil *Calmette-Guérin*

CD – razlikovno obilježje (eng. *Cluster of Differentiation*)

CDC – Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (eng. *Center for Disease Control and Prevention*)

CFP-10 – protein 10 filtrata kulture (eng. *Culture Filtrate Protein-10*)

ECDC – Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti (eng. *European Centre for Disease Prevention and Control*)

ELISA – enzimski vezan imunosorbent test (eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

ELISPOT – enzimski vezan imunospot test (eng. *Enzyme-Linked Immunospot Assay*)

ESAT-6 – rano-sekretorna antigenična ciljna specifična T-stanica-6 (eng. *early secretory antigenic target-6-specific T cell*)

HIV – humani imunodeficijentni virus (eng. *Human Immunodeficiency Virus*)

HLA – humani leukocitni antigen

IFN- $\gamma$  – interferon gama (eng. *Interferon Gamma*)

IFNGR1 – receptor-1 interferona gama (eng. *receptor-1 Interferon Gamma*),

IGRA – test otpuštanja interferona gama (eng. *Interferon Gamma Release Assay*)

IL – interleukin

IL12RB1 – receptor beta-1 interleukina 12 (eng. *Receptor Beta-1 Interleukin 12*)

LTBI – latentna tuberkulozna infekcija (eng. *Latent Tuberculosis Infection*)



MBL – lektin koji veže manozu (eng. *Mannose Binding Lectin*),

MHC – glavni kompleks tkivne podudarnosti (eng. *Major Histocompatibility Complex*)

MHC-antigene klase I – glavni kompleks tkivne podudarnosti antigene klase I (eng. *Major Histocompatibility Complex*)

MHC-antigene klase II – glavni kompleks tkivne podudarnosti antigene klase II (eng. *Major Histocompatibility Complex*)

NICE – Nacionalni institut za zdravlje i kliničku izvrsnost (eng. *National Institute for Health and Clinical Excellence*)

NRAMP-1 gen – gen za prirodenu rezistenciju makrofagnog proteina 1 (eng. *Natural Resistance-Associated Macrophage Protein-1*)

PCR – lančana reakcija polimerazom (eng. *Polymerase Chain Reaction*)

PHA – fitohemaglutinin (eng. *phytohemagglutinin*)

PPD – purificirani proteinski derivat (eng. *Purified Protein Derivative*)

QFT-GIT – *QuantiFERON-TB Gold In Tube*

SD – standardna devijacija

STAT – pretvarači signala i aktivatori prepisivanja (eng. *Signal Transducers and Activators of Transcription*)

SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

TBC – tuberkuloza

TB7.7(p4) – tuberkulozni protein 7.7(p4)

Th – pomoćnički limfocit T (eng. *T-helper lymphocyte*)

TNF- $\alpha$  – faktor tumorske nekroze alfa (eng. *Tumor Necrosis Factor Alpha*)

TST – tuberkulinski kožni test (eng. *Tuberculin Skin Test*)

VDR – receptor vitamina D (eng. *Vitamine D Receptor*)

$\bar{x}$  – aritmetička sredina

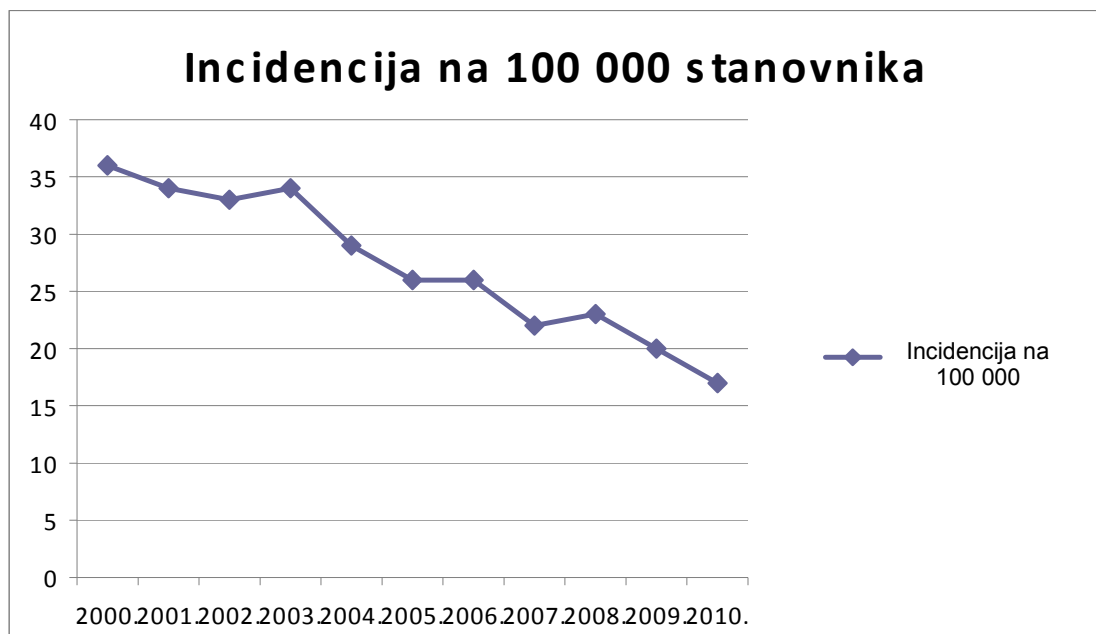
## 1. UVOD

Tuberkuloza (TBC) jest zarazna bolest uzrokovana humanim mikobakterijem tuberkuloze (*Mycobacterium tuberculosis*, *M.tuberculosis*). Iako se smatralo da je bolest pod kontrolom, u zadnje se vrijeme ponovno pojavila kao jedan od glavnih javno-zdravstvenih problema, osobito u nerazvijenim zemljama. Prema izvješću Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) tijekom 2010. godine od tuberkuloze je oboljelo 8,8 milijuna svjetskog stanovništva, a 1,1 milijun je umrlo (1). Globalna incidencija tuberkuloze u 2010. godini je iznosila 128/100 000 stanovnika. Zabrinjavaju procjene da bi do 2020. godine milijarda ljudi mogla biti zaražena mikobakterijem tuberkuloze, 200 milijuna bi moglo oboljeti, a 35 milijuna umrijeti od TBC-a (2). Razlog takvoj zabrinjavajućoj epidemiološkoj slici jest slaba kontrola bolesti, neodgovarajuća procijepljenost odraslih i pandemija sindroma stečene imunodeficijencije, AIDS (eng. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*).

U Europi se postupno smanjuje broj oboljelih od tuberkuloze, pa se stopa incidencije od 2004. godine kada je iznosila 104/100 000 stanovnika smanjila na 47/100 000 stanovnika tijekom 2010. godine. Međutim, postoji velika razlika između zemalja zapadne i istočne Europe. U zapadnoeuropskim zemljama incidencija je manja od 15/100 000 stanovnika uz izuzetak Portugala gdje iznosi 29/100 000 stanovnika, dok je u istočnoeuropskim zemljama veća od 50/100 000 stanovnika, a svakako prednjače Moldavija sa stopom incidencije od 182/100 000 stanovnika, te Kazahstan 151/100 000 stanovnika. Hrvatska pripada u skupinu zemalja sa srednje visokom incidencijom koja je u 2010. godini iznosila 17/100 000 stanovnika (3). Prema podacima Zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ tijekom 2010. godine prijavljeno je 768 osoba oboljelih od tuberkuloze,

što čini incidenciju od 17 oboljelih na 100 000 stanovnika (3). Cilj javno-zdravstvenog djelovanja jest da se broj oboljelih smanji na manje od 10 na 100 000 stanovnika.

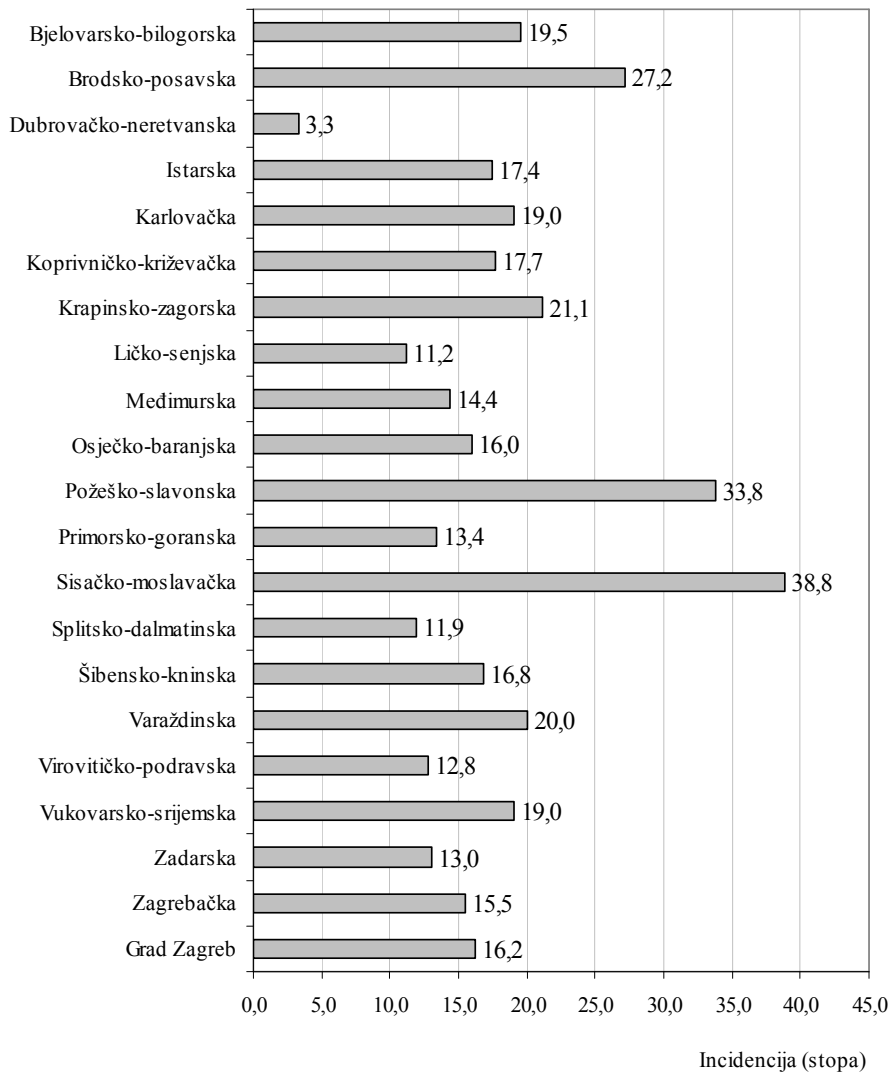
U nekim zemljama je zabilježen porast incidencije tuberkuloze, prvenstveno kao posljedica migracije stanovništva, ali i porasta broja oboljelih od AIDS-a (4). Hrvatska se nalazi u skupini zemalja u kojima se posljednjih godina uočava smanjenje broja oboljelih od tuberkuloze, pa je tako od 2000. godine, kada je stopa incidencije u općoj populaciji iznosila 36/100 000 došlo do smanjenja incidencije na 17/100 000 stanovnika u 2010. godini (Slika 1).



**Slika 1.** Incidencija bolesnika s aktivnom tuberkulozom u Hrvatskoj od 2000. do 2010. godine

Najveći morbiditet postoji u osoba starijih od 60 godina, a u dječjoj dobi najčešće obolijevaju adolescenti. Dobna raspodjela bolesnika odgovara onoj u razvijenim zemljama, s najvišim morbiditetom u najstarijoj životnoj dobi. Razlike u pobolu u

županijama (Slika 2) kreću se u rasponu od 3,3/100 000 stanovnika u Dubrovačko-neretvanskoj županiji do 38,8/100 000 stanovnika u Sisačko-moslavačkoj županiji. Ovakve razlike među županijama dijelom su povijesno uvjetovane, dijelom geografski, a dijelom su posljedica recentnih ratnih i poratnih migracija stanovništva.



**Slika 2.** Incidencija tuberkuloze u hrvatskim županijama 2010. godine

Proširenost tuberkuloze među djecom nije dovoljno poznata, a razlozi tome leže u činjenici da se dijagnoza dječje tuberkuloze postavlja teže nego u odraslih, uz češću

pojavu izvanplućnih oblika bolesti. Procjenjuje se da se u svijetu tuberkuloza kod djece pojavljuje u oko 10% ukupno novooboljelih slučajeva godišnje (1). U zemljama s velikom incidencijom tuberkuloze, udio djece među oboljelima iznosi 25 – 40%, s incidencijom u dječjoj populaciji do 60 – 600/100 000, dok u zemljama male incidencije tuberkuloze udio djece među oboljelima iznosi 4 – 7% uz incidenciju od 1 – 15/100 000. U Hrvatskoj je incidencija tuberkuloze dječje dobi tijekom 2010. godine po dobnim skupinama iznosila: u dobi od 0-4 godine 0,0/100 000, u dobi od 5-9 godina 2,8/100 000, u dobi od 10-14 godina 6,3/100 000, te u dobi od 15-19 godina 7,7/100 000 (Tablica 1) (2).

**Tablica 1.** Kretanje incidencije tuberkuloze (na 100 000 djece) dječje dobi po dobnim skupinama u Hrvatskoj od 2000. do 2010. godine

<b>Dob</b>	<b>2000.</b>	<b>2001.</b>	<b>2002.</b>	<b>2003.</b>	<b>2004.</b>	<b>2005.</b>	<b>2006.</b>	<b>2007.</b>	<b>2008.</b>	<b>2009.</b>	<b>2010.</b>
0-4	4,9	2,6	6,3	2,5	2,9	0,8	2,1	2,1	2,1	0,8	0,0
5-9	6,3	6,7	7,6	10,9	6,0	4,0	2,8	3,6	2,0	3,2	2,8
10-14	11,5	11,2	12,7	11,5	8,2	5,2	6,3	3,7	6,3	5,6	6,3
15-19	15,2	16,2	12,4	13,1	14,4	11,1	9,4	7,4	6,4	7,0	7,7

Procjenjuje se da je 1/3 svjetskog stanovništva inficirano s *M. tuberculosis*, većina kao latentna tuberkulozna infekcija (LTBI), uz vjerojatnost za obolijevanje od aktivne tuberkuloze tijekom života kod odraslih osoba s normalnim imunološkim odgovorom od 5 - 10% (5). Ta je vjerojatnost kod djece znatno veća, pa je poznato da je rizik za

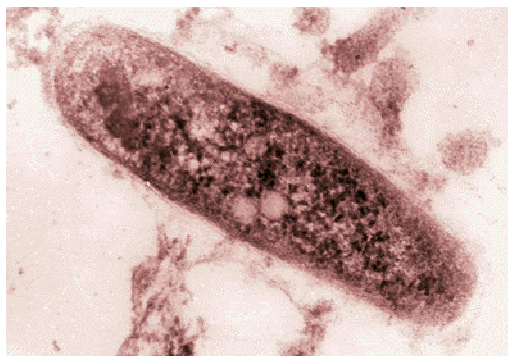
obolijevanje od aktivne tuberkuloze kod djece mlađe od 2 godine života do 40%, da bi se potom s dobi rizik smanjivao do adolescentne dobi, nakon koje se lagano povećava (6-8). Također je poznato da se kod djece mlađe od pet godina češće pojavljuje diseminacija bolesti u smislu milijarne tuberkuloze i tuberkuloznog meningitisa, koji su povezani s većom smrtnosti. U Hrvatskoj u prethodne četiri godine nije zabilježen niti jedan slučaj tuberkuloznog meningitisa u dječjoj dobi, što je jedan od pokazatelja uspješnosti obveznog cijepljenja BCG-om (BCG - *Bacillus Calmette-Guérin*). Naime, u našoj se državi provodi obvezno cijepljenje novorođenčadi u rodilištima, a 2010. godine cijepljenjem je bilo obuhvaćeno 98,7% novorođenčadi, što je iznad zakonskog minimuma od 95%. Poznato je da cijepljenje BCG-om pruža zaštitu od tuberkuloznog meningitisa u djece, ali ne sprječava pojavu plućne tuberkuloze ni u adolescenata ni i odraslih (9). Od uvođenja obveznog cijepljenja, uvedene su i određene promjene, pa je tako ukinuto docijepljivanje nereaktora u drugoj godini života i u drugom razredu osnovne škole, a s padom incidencije tuberkuloze planira se ukinuti i ono u sedmom razredu osnovne škole. Kod adolescenata, koji među dječjom populacijom imaju najveću stopu incidencije tuberkuloze, oblik bolesti se pomiče prema adultnom tipu karakteriziranom pojavom kaverni i apikalnih plućnih infiltracija.

Dječja tuberkuloza predstavlja dobar indikator učinkovitosti borbe protiv tuberkuloze, obzirom da se radi o recentnoj infekciji, a ne o reaktivaciji bolesti, te zapravo reflektira prijenos uzročnika i cirkulirajućih sojeva u populaciji. Kako bi se smanjila incidencija tuberkuloze potrebno je otkriti i adekvatno tretirati osobe s latentnom tuberkuloznom infekcijom.

## 1.1. *Mycobacterium tuberculosis*

### 1.1.1. Opće karakteristike

Uzročnika tuberkuloze, *M. tuberculosis* (Slika 3), otkrio je 1882. godine Robert Koch. Radi se o aerobnom, fakultativno unutarstaničnom, spororastućem acidofilnom bacilu, s generacijskim vremenom od 14 - 22 sata, koji je prirodno patogen samo za ljude (10).



**Slika 3.** *M. tuberculosis*, snimljen elektronskim mikroskopom

Unutar bacila *M. tuberculosis* ima oko 1000 proteina, koji su moguće antigene komponente, a smatra se da samo manji broj njih ima ulogu u imunološkom odgovoru na infekciju s *M. tuberculosis*, te se označavaju kao imunodominantni antigeni (11). Za razliku od proteina koji se nalaze unutar stanice ili u staničnoj stijenci bacila *M. tuberculosis*, poznato je i da postoje proteini koje kao proizvod metabolizma taj bacil izlučuje, često izazivajući snažniji imunološki odgovor (12).

Stanična stijenska *M. tuberculosis* je građena od četiri sloja: prvi sloj je peptidoglikan (murein) koji je kovalentno vezan na polisaharid arabinogalaktan, koji predstavlja drugi sloj. Na njega se vežu mikolične kiseline koje čine treći sloj. Četvrti, površinski sloj, čine peptidoglikolipidi, sulfolipidi, *cord*-činitelj (trehalosa 6,6 dimikolat) i voskovi. Tu se

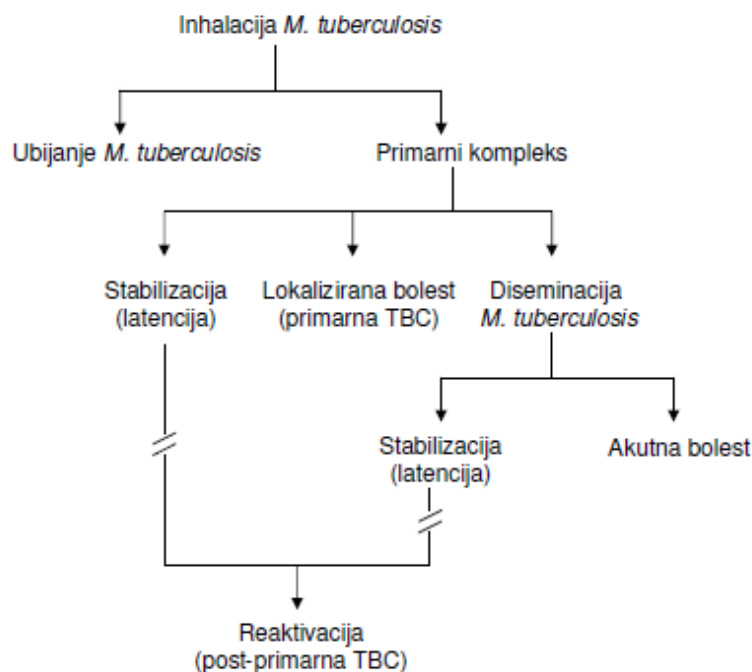


nalaze receptori za makrofage i seroaglutinaciju. Mikolična kiselina i lipidi staničnog zida uzrok su veće otpornosti prema nižim koncentracijama kiselina i lužina (12).

### **1.1.2. Patomehanizam tuberkulozne infekcije**

Mikobakteriji dospijevaju u organizam najčešće kapljičnom infekcijom u kontaktu s oboljelim koji kašlje, kiše ili pjeva, premda su mogući i drugi iznimno rijetki oblici prijenosa, kao npr. ingestijom zaraženog mlijeka, preko sluznica ili oštećenja na koži. Iako bolest može zahvatiti bilo koji organ ljudskog tijela, najčešća ulazna vrata infekcije su pluća, koja su u do 90% slučajeva i sjelo kasnijeg razvoja bolesti (13).

U većine osoba prirodni tijek infekcije s *M. tuberculosis* (Slika 4) završava uspješnom aktivacijom imunološkog odgovora što dovodi do uništenja klice, iako su moguća još tri ishoda (14, 15). *M. tuberculosis* se odmah nakon infekcije može nastaviti umnožavati i rasti, uzrokujući primarnu tuberkulozu. Zatim je moguća latentna infekcija s *M.tuberculosis*, koja označava stanje perzistentnog imunološkog odgovora bez kliničkih znakova bolesti, a nije u potpunosti jasno da li je obvezno povezana s prisustvom viabilnih bacila (16). Moguće je da u određenom vremenu tijekom latentne infekcije dođe do množenja i rasta bacila *M. tuberculosis*, što uzrokuje klinički manifestnu bolest koja se označava kao postprimarna tuberkuloza. Imunost na *M. tuberculosis* razlikuje se između odraslih i djece time što je kod djece funkcija makrofaga i funkcija dendritičkih stanica nezrela, nepotpun je razvoj Th1-tipa T-stanične imunosti, te povećana sklonost dojenčadi i male djece da u reakciji na imunogene podražaje odgovaraju Th2 CD4+ tipom stanične imunosti (17). Odnos između imunoreakcije domaćina i mikrobnih faktora utječe na uspostavljanje i održavanje stanja latencije.

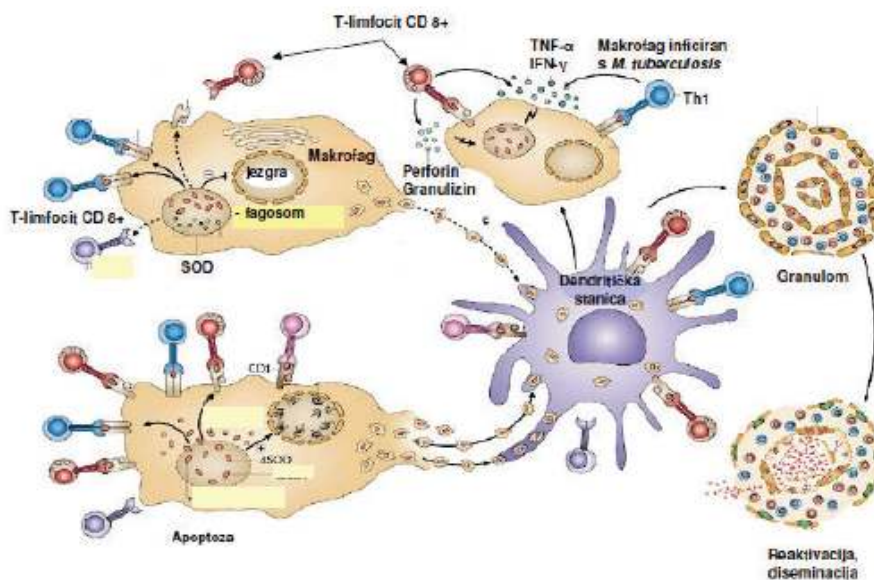


**Slika 4.** Kronologija zbivanja nakon inhalacije *M. tuberculosis* (15)

Udahnete bacile fagocitiraju alveolarni makrofagi i dendritičke stanice, a poznato je da je fagocitoza potaknuta vezanjem mikobakterija za Toll-u slične receptore, te za imunoglobulinske i komplementne receptore makrofaga (9). Smatra se da vezanje mikobakterija za Toll-u slične receptore i imunoglobulinske receptore na staničnoj membrani makrofaga pobuđuje imunoreakciju koja dovodi do destrukcije mikobakterija, dok se vezanjem za komplementne receptore pobuđuje reakcija koja nije učinkovita, što dovodi do preživljenja fagocitirane klice (18-20).

Nakon fagocitiranja bacila formira se fagosomsko-lizosomski kompleks u kojem su bacili izloženi djelovanju reaktivnih radikala kisika i dušika, te litičkih enzima iz lizosoma. Aktivaciju makrofaga, koja rezultira sintezom radikala i stvaranjem fagosomsko-lizosomskog kompleksa, potiču dva interleukina: interferon gama (IFN- $\gamma$ ) kojeg izlučuju

senzibilizirani limfociti T nakon dodira sa zaraženim makrofazima i faktor tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ) kojeg izlučuju sami makrofagi u obliku autokrine stimulacije (20, 21). Ključnu ulogu u imunološkom odgovoru na *M.tuberculosis* ima aktivacija citotoksičnog oblika imunosti, kojeg ostvaruju pomagački CD4+ limfociti T tipa 1 (Th1) i citotoksični CD8+ limfociti T (Slika 5). Za aktivaciju limfocita T, te usmjeravanje i proliferaciju limfocita u tip Th1 važno je djelovanje interleukina (IL)-2 i IL-12, te IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  je najvažniji citokin u obrani od infekcije mikobakterijem, a za njegovu sintezu su uz IL-12, važni i drugi citokini, kao IL-23, IL-18 i IL-27 (22). Djelovanje IFN- $\gamma$  u obrani od infekcije mikobakterijem se očituje kroz povećanu ekspresiju molekula MHC, što pridonosi boljoj prezentaciji antigena, kroz povećanu ekspresiju imunoglobulinskih receptora čime je olakšana fagocitoza, te kroz privlačenje limfocita T i povećanje sinteze dušičnog oksida (22, 23).

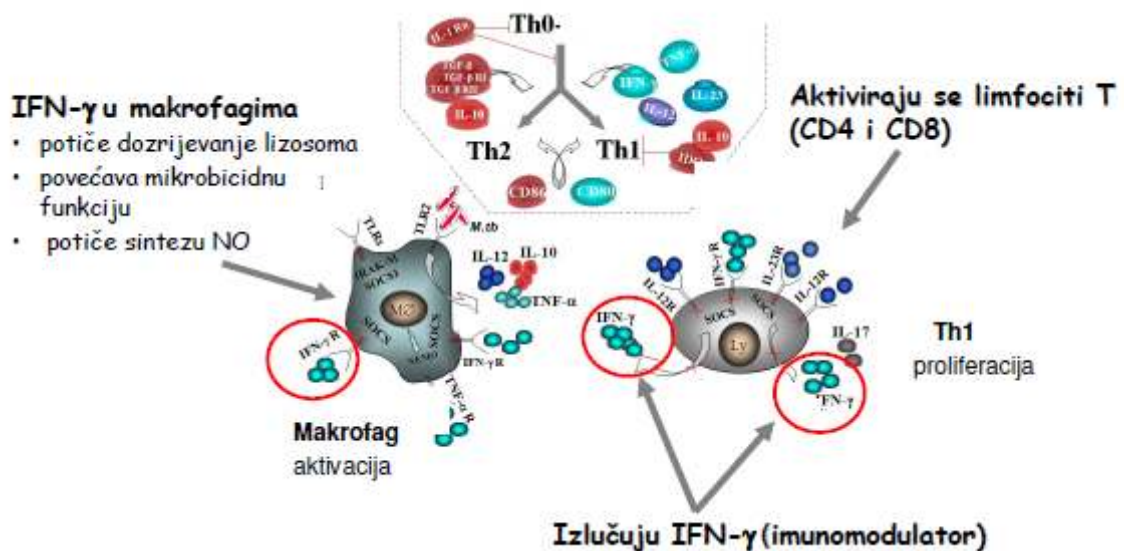


**Slika 5.** Stanični nespecifični imunološki odgovor što s *M. tuberculosis* aktivira makrofage i dendritične stanice (21)

Čini se da IFN- $\gamma$  može aktivirati ekspresiju pojedinih gena bitnih za sintezu proupalnih citokina u makrofagima (22, 24). Jedna od najvažnijih uloga IFN- $\gamma$  u tuberkuloznoj infekciji je aktiviranje inficiranih alveolarnih makrofaga i poticanje njihove mikrobicidne aktivnosti pomoću dušičnog oksida (NO) i reaktivnih kisikovih spojeva (23-26). Stanični imuni odgovor na *M. tuberculosis* posredovan je i citotoksičnim limfocitima T, koji liziraju inficirane alveolarne makrofage i uništavaju unutarstanični bacil pomoću molekula perforina i granulizina (27). Mikobakterijski antigeni koji se oslobađaju razgradnjom u fagosomsko-lizosomskom kompleksu vežu se za MHC-antigene klase II (eng. *major histocompatibility complex*, MHC II), te se na površini stanične membrane predočavaju CD4+ T-limfocitima, koji nakon senzibilizacije oslobađaju IFN- $\gamma$ . Dakle, za pokretanje specifične imunoreakcije staničnog tipa (Th1) bitno je da mikobakterijski antigeni budu prepoznati u sklopu MHC II (25, 28, 29). Prepoznavanju pridonosi i sustav CD1 koji je manje specifičan od sustava MHC, ali je važan stoga što prepoznaje glikolipidne antigene mikobakterijske stijenke te aktivira nespecifičnu imunoreakciju pokrećući početno izlučivanje IFN- $\gamma$  (30, 31). Tako povezuje početnu, nespecifičnu s kasnijom, specifičnom imunoreakcijom. Mikobakteriji se sa svoje strane odupiru imunoreakciji na različite načine (32). Svojim proizvodima potiču izlučivanje IL-4 i IL-10 koji skreću imunoreakciju u humoralni (Th2) oblik koji za mikobakterije nije opasan, jer se mikobakteriji nalaze unutar makrofaga (intracelularno), pa ih protutijela ne mogu doseći. Neki antigeni mikobakterijske stijenke potiskuju izlučivanje IFN- $\gamma$  tako što u jezgri limfocita ograničavaju vezanje STAT1 za transkripcijske aktivatore sinteze interferona (33). Glikolipid mikobakterijske stijenke lipoarabinomanan ograničava izlučivanje IL-12 i sprječava dozrijevanje dendritičkih stanica (potrebnih za predočavanje

mikobakterijskih antigena limfocitima), a s druge strane potiče izlučivanje imunosupresivnog citokina IL-10 (34-38).

IFN- $\gamma$  se također oslobađa iz aktiviranih citotoksičnih CD8+ T-limfocita. To se događa nakon kontakta s kompleksima peptidnih fragmenata razgrađenih mikobakterijskih proteina i MHC-antigene klase I na staničnoj membrani (39). IFN- $\gamma$  oslobođen iz limfocita T aktivira makrofage i na taj način pospješuje mikrobicidno djelovanje makrofaga (Slika 6).



Slika 6. Uloga IFN- $\gamma$  u tuberkuloznoj infekciji

Iz tako aktiviranih citotoksičnih CD8+ T-limfocita oslobađaju se i proteolitički enzimi, koji dovode do raspada zaraženog makrofaga, a time i mikobakterija (40). Također vezanjem senzibiliziranih limfocita T na zaraženi makrofag, odašilje se signal kojim se zaustavljaju metabolički procesi u jezgri i citoplazmi što dovodi do propadanja zaraženog

makrofaga, a time i do propadanja mikobakterija (18). Iz senzibiliziranih limfocita T oslobađaju se interleukini koji potiču migraciju makrofaga, limfocita T i limfocita B na mjesto infekcije, što u konačnici dovodi do stvaranja karakterističnih staničnih infiltrata oko zaraženih makrofaga, tj. granuloma (41). Granulom se sastoji od makrofaga koji mogu formirati epiteloidne stanice ili multinuklearne orijaške stanice, od CD4+ i CD8+ limfocita T, te od limfocita B (42, 43). U tako formiranom granulomu sprječava se širenje bacila tuberkuloze, te je ujedno olakšano međudjelovanje i funkcioniranje makrofaga, limfocita T i citokina (20). Vrlo važni citokin za stvaranje i održavanje strukture granuloma je TNF- $\alpha$  (44). Taj citokin aktivira pridošle makrofage, koji tada proizvode litičke enzime i uništavaju bacile (45). Litički enzimi su ujedno uzrok nastajanja nekroze plućnog tkiva. Danas je poznato da se formiraju najmanje dva tipa fiziološki različitih granulomatoznih lezija (46-48). Klasični kazeozni granulom sastoji se od epitelnih makrofaga, neutrofilnih granulocita i drugih imunoloških stanica okruženih fibroblastima, te ima nekrotično hipoksično središte gdje se nalaze makrofagi unutar kojih je nastanjen *M. tuberculosis* (48). Drugi tip granuloma su fibrotične lezije sastavljene uglavnom od fibroblasta i vrlo malo makrofaga, a gdje se točno nalazi viabilni *M. tuberculosis* u ovom tipu granuloma do danas nije poznato (48). S formiranjem granuloma i uspješnim imunološkim odgovorom domaćina većina bacila tuberkuloze biva ubijena, a progresija bolesti zaustavljena (26, 41). Utvrđeno je da neke osobine u mikrookolišu granuloma, kao što su hipoksija, niski pH, prisutnost dušičnog oksida, ugljikovog monoksida i drugih faktora, povećavaju ekspresiju nekoliko gena *M. tuberculosis* koji su uključeni u indukciju stanja latencije (50, 51).

### 1.1.3 Polimorfizam gena i tuberkuloza

Na klinički ishod bolesti uz virulenciju mikobakterija i socioekonomske činitelje, znatno utječe polimorfizam nekih gena: lokus za humani leukocitni antigen (HLA-DR2, podtip DRB1\* 1501 i HLA-DQ1, lokus 10p13), lektin koji veže manozu (*mannose binding lectin*, MBL), receptore vitamina D (VDR), TNF- $\alpha$  i  $\beta$ , antagonist receptora IL-1, gen SLC11A1 (bivši NRAMP-1 gen, engl. *natural resistance-associated macrophage protein-1*, gen za prirodenu rezistenciju makrofagnog proteina 1) (52). SLC11A1 gen je uključen u aktivaciju makrofaga i ubijanje mikobakterija, a tijekom fagocitoze postaje dio fagosoma, stoga njegova mutacija onemogućuje fagocitozu (53-57). Genom *M. tuberculosis* također je podložan mutacijama, što predstavlja opasnost pri infekciji i obrani od bolesti (58). Kao što je već naglašeno, za otpornost prema *M. tuberculosis* važan je IFN- $\gamma$ , stoga mutacije gena pri imunoreakcijama u kojima on sudjeluje mogu dovesti do teških oblika infekcije. To su geni IFNGR1 (eng. *receptor-1 interferon gamma*), IFNGR2, IL12B (eng. *interleukin-12 beta*), i IL12RB1 (eng. *receptor beta 1 interleukin 12*) (59-62).

## **1.2. TUBERKULOZA**

### **1.2.1. Definicija tuberkuloze**

Tuberkuloza je zarazna bolest uzrokovana bacilom *M. tuberculosis*, iako i drugi mikobakteriji, poput *M. bovis* i *M. africanum* mogu biti uzročnici tuberkuloze, što je u Europi iznimno rijetko.

#### **1.2.1.1. Primarna tuberkuloza**

Primarna tuberkuloza nastaje u djeteta nakon prvog susreta s uzročnikom tuberkuloze, a karakterizirana je stvaranjem tzv. primarnog kompleksa koji se sastoji od primarnog žarišta na ulaznim vratima infekcije, te patoloških promjena u regionalnim limfnim čvorovima (limfangitis i pripadajuća limfadenopatija) (63). Ovisno o ulaznom mjestu razlikuju se sljedeći oblici primarne tuberkuloze: tuberkuloza pluća, tuberkuloza tonzila, tuberkuloza crijeva, te tuberkuloza kože. Za razliku od djece školske dobi i adolescenta kod kojih primarna tuberkulozna infekcija uglavnom protječe asimptomatski, kod dojenčadi i djece predškolske dobi češće se očituje općim i lokalnim kliničkim simptomima. Lokalni simptomi ovise o ulaznim vratima, odnosno o sijelu primarnog kompleksa, a mogu u potpunosti nedostajati, pa se bolest očituje kao vrućica nepoznatog porijekla. Stoga, u takvim situacijama treba diferencijalno dijagnostički razmišljati i o primarnoj tuberkulozi.

#### **1.2.1.2. Postprimarna tuberkuloza**

Postprimarna tuberkuloza je bolest koja se razvija u pacijenata koji su ranije neprimjetno ili manifestno bolovali od tuberkuloze, a nastaje kao posljedica rasapa tuberkuloznih



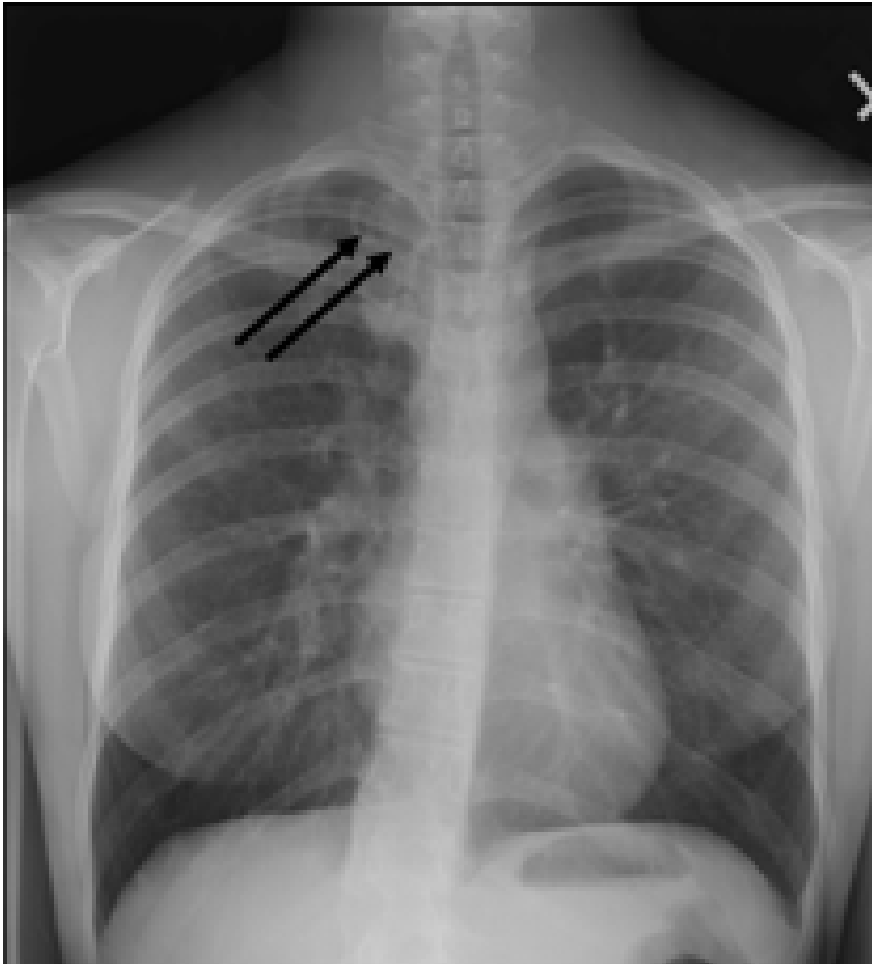
bacila iz primarnog ili nekog drugog žarišta. S obzirom na lokalizaciju patološkog procesa jasno je da nije posljedica primarnog dodira s bacilom tuberkuloze. Za razliku od primarne tuberkuloze u ovom obliku tuberkuloze nema otoka regionalnih limfnih čvorova. Najvažniji oblici postprimarne tuberkuloze su milijarna tuberkuloza, tuberkulozni meningitis, tuberkulozni pleuritis i peritonitis, osteoartikularna tuberkuloza i tuberkuloza bubrega.

### **1.2.2. Dijagnostika tuberkuloze**

Sumnja na tuberkulozu u djece se postavlja nakon detaljno uzete anamneze, temeljem nespecifičnih simptoma, kao što su vrućica i neproduktivni kašalj u trajanju duljem od 2-3 tjedna, bolovi u prsnom košu, noćno znojenje, smanjena aktivnost, gubitak na tjelesnoj masi i lagano otežano disanje (64, 65). Dijagnoza tuberkuloze kod djece postavlja se temeljem anamneze, epidemioloških podataka, kliničke slike, laboratorijskih pretraga krvi, te radioloških, bakterioloških i imunoloških pretraga (66). Temelj dijagnoze i jedini sigurni dokaz tuberkuloze je izolacija bacila *M. tuberculosis* iz bioloških materijala, a za uspješnu izolaciju je važna kvaliteta uzorka koji se analizira (67). Postavljanje dijagnoze dječje tuberkuloze je zahtjevan postupak u pedijatrijskoj pulmologiji, jer su simptomi i znakovi bolesti vrlo diskretni, nema samoprepoznavanja bolesti, pozitivnost direktnih mikroskopskih razmaza u djece je oko 10 – 15%, rezultati pozitivnih kultura se kreću između 30-50%, u djece manje životne dobi i manje od 20%, a uzorkovanje dijagnostičkih materijala je moguće u bolničkim uvjetima (68-71).

Budući da tuberkulozom najčešće bivaju zahvaćena pluća, radiogram pluća je sastavni dio algoritma dijagnostičke obrade pri sumnji na tuberkulozu (72, 73). Promjene na

radiogramu pluća koje uz ostale kliničke i laboratorijske nalaze mogu upućivati na tuberkulozu su hilarna i/ili medijastinalna limfadenopatija, zatim peribronhitične infiltracije specifičnog karaktera, upalne lezije u parenhimu, segmentalne ili lobarne hiperinflacije, atelektaze, alveolarne konsolidacije, te pleuralni izljev (74, 75). Lako prepoznatljivi radiološki nalazi su kavernoza stanja (Slika 7) i milijarni rasapi (Slika 8), koji uz dobru suradnju s kliničarem u velikom broju slučajeva daju točnu dijagnozu uz obveznu potvrdu daljnjom obradom. Kavernoza stanja su u male djece iznimno rijetka, češće se vide u adolescentnoj dobi (76).



**Slika 7.** Kavernozni oblik dječje tuberkuloze

Milijarna tuberkuloza radiološki se očituje mikronodularnim, makronodularnim ili granuloretikularnim oblicima, a najčešća je kod dojenčadi i male djece (77).

Standardnim hematološko-biokemijskim pretragama procjenjuju se opće stanje organizma, te funkcija jetre i bubrega prije početka terapije antituberkuloticima, a tijekom provođenja terapije i zbog praćenja mogućih nuspojava antituberkulotika.



**Slika 8.** Milijarna tuberkuloza

Budući da je jedini sigurni dokaz tuberkuloze izolacija *M. tuberculosis* iz biološkog materijala bolesnika, mikrobiološka dijagnostika zauzima važno mjesto u dijagnostičkom algoritmu obrade sumnje na dječju tuberkulozu. Za mikrobiološku dijagnostiku uzorkuju se iskašljaj, pleuralni izljev, bronhoalveolarni ispirak, ispirak želudca, mokraća, krv,

stolica, cerebrospinalna tekućina i bioptički materijali zahvaćenih organa, a uspješnost dijagnostike ovisna je o kvaliteti samog uzorka poslanog na analizu.

Metode konvencionalne mikrobiološke dijagnostike kod djece podrazumijevaju: otkrivanje acidorezistentnih bacila (ARB) izravnim mikroskopskim pregledom, kultivaciju na krutim i tekućim podlogama, te ispitivanje osjetljivosti na antituberkulotike (78). Metoda izravne mikroskopije temelji se na činjenici da ovojnica mikobakterija tuberkuloze zbog sadržaja velike količine lipida veže bazičnu boju. Za pozitivnost mikroskopskog nalaza veću od 95% potrebno je da u 1 mL sputuma bude više od 10 000 bacila (69). Prednost izravne mikroskopije je jednostavnost izvedbe, brzina izvođenja pretrage, a nedostatak je mala osjetljivost i nemogućnost razlučivanja *M.tuberculosis* od drugih mikobakterija. Poznato je da se u djece koja boluju od tuberkuloze nađe svega 10 – 15% pozitivnih nalaza mikroskopskog razmaza (69).

Kultivacija, kod koje se uzorak inokulira na specifične hranjive podloge, najvažnija je mikrobiološka metoda jer se njome identificira soj. Podloge mogu biti krute i tekuće. Od krutih kod nas se najčešće upotrebljava hranilište po Löwenstein-Jensenu, a najveći postotak porasta kultura je u vremenu od 3-6 tjedana. Od tekućih podloga najčešće se primjenjuje hranilište u sistemu BACTEC TB, u kojem se nalazi fluoresceinom označena komponenta koja se za vrijeme rasta *M. tuberculosis* raspada. Određivanjem količine raspadnutog produkta određuje indeks rasta za najduže 10 dana. Postoje i takozvani bifazični sistemi, koji su kombinacija krutog i tekućeg hranilišta. Prednost metoda kultivacije je velika specifičnost, a nedostatak je dugotrajnost postupka posebno za neke metode. Rezultati pozitivnih kultura kod dječje tuberkuloze kreću se od 30 – 50% , no važno je napomenuti da negativne kulture nikada ne isključuju dijagnozu dječje

tuberkuloze (79, 80). Kod svake pozitivne kulture obvezno je učiniti test rezistencije kojim se ispituje osjetljivost na antituberkuloznu terapiju.

Velika očekivanja u poboljšanju brzine i točnosti dijagnostike tuberkuloze su bila u primjeni tehnika molekularne biologije, kojima se izravno u biološkom uzorku već za nekoliko sati upotrebom amplifikacijskih tehnika mogu otkriti i minimalne količine ciljne nukleinske kiseline (81). No, iskustvo je pokazalo da najčešće upotrebljavani postupak umnožavanja lančanom reakcijom polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) nije dao mnogo bolje rezultate, te osim male osjetljivosti i specifičnosti postoji mogućnost lažno pozitivnih nalaza (69).

### **1.2.3. Terapija tuberkuloze**

Do 1944. godine, kada su otkriveni prvi učinkoviti lijekovi protiv tuberkuloze (streptomycin i para-aminosalicilna kiselina), osnova terapije tuberkuloze sastojala se od kombinacije higijensko-dijetetskih mjera i kirurških postupaka. Danas, osnovu terapije tuberkuloze čini kombinacija četiri antituberkulotika: izoniazid, rifampicin, pirazinamid i etambutol, te alternativno i streptomycin. Zbog mogućeg trajnog oštećenja slušnog živca, te izrazito bolnih injekcija streptomycin treba izbjegavati u liječenju dječje tuberkuloze kad god je to moguće. Načelo je da se od početka liječenja do vidljivog dobrog odgovora organizma, tj. do prispjeha negativnih kultura na *M. tuberculosis* djeca liječe u bolnici. U inicijalnoj fazi liječenja koja traje dva mjeseca, dječja tuberkuloza se liječi s barem tri lijeka (izoniazid, rifampicin i pirazinamid), a prema procjeni pedijatra pulmologa može se dodati i etambutol. Nakon inicijalne faze slijedi faza nastavka liječenja u trajanju od četiri mjeseca tijekom koje se primjenjuju dva lijeka (izoniazid i rifampicin).

### **1.3. LATENTNA TUBERKULOZNA INFEKCIJA**

#### **1.3.1. Definicija latentne tuberkuloze**

Stanje koje nastaje nakon infekcije mikobakterijem tuberkuloze, u kojem bacil miruje, ne dijeli se i ne izaziva reakciju okolnog tkiva, te u kojem inficirani nema znakova bolesti niti je zarazan za okolinu definira se kao LTBI. U bilo kojem razdoblju tijekom života može doći do aktivacije klica i do razvoja aktivne tuberkuloze. Vjerojatnost aktivacije je veća u djece nego u odraslih i ovisna je o dobi: u dojenčadi je 43%, u djece u dobi od 1-5 godina iznosi 29%, a u djece od 11-15. godina iznosi 15% (6, 8, 82). Osobe s LTBI rezervoar su budućih bolesnika, pa kad se govori o eradikaciji tuberkuloze nije dovoljno liječiti samo bolesnike s aktivnom tuberkulozom, nego i dijagnosticirati te adekvatno tretirati osobe s LTBI.

Dvije su skupine djece u kojih se aktivno traga za LTBI: djeca koja su bila u kontaktu s aktivnim tuberkuloznim bolesnikom i djeca koja su tuberkulinski hiperreaktori nakon redovnog testiranja purificiranim proteinskim derivatom (PPD). Najzarazniji su tuberkulozni bolesnici koji u 1 mL iskašljaja izlučuju više od 10 000 bacila, tj. u fazi bolesti kada je pozitivan nalaz izravne mikroskopije iskašljaja, a najveća opasnost od infekcije je kod bliskog kućnog kontakta (68). U obitelji u kojoj živi tuberkulozni bolesnik koji ima izravno mikroskopski pozitivan nalaz acidorezistentnog bacila, opasnost od zaraze je 50-60%, a u slučaju pozitivnog nalaza mikobakterija tuberkuloze u kulturi opasnost je 20% (83). Velika nepoznanica u biologiji TBC-a je uspostavljanje i perzistencija latentnog oblika infekcije u kojem određeni broj mikobakterija može ostati "uspavan", ali viabilan tijekom mnogo godina.

### 1.3.2. Dinamički model latentne tuberkulozne infekcije

LTBI je tradicionalno definirana kao infekcija s *M. tuberculosis* na mjestu unutar granuloma gdje ostaje u nereplicirajućem stanju, ali zadržava sposobnost da iziđe iz stanja mirovanja i uzrokuje aktivnu TBC. Međutim, nedavni eksperimentalni podatci podržavaju dinamički model LTBI, po kojem se stalno odvija endogena reaktivacija i upalni odgovor (84). Model sugerira da za vrijeme rane faze infekcije tijekom koje se razvija granulom, *M. tuberculosis* raste unutar fagosoma. Neki se bacili, oslobođeni iz nekrotičnih makrofaga u izvanstanični prostor, prestaju razvijati zahvaljujući uvjetima koji tamo vladaju (acidoza, hipoksija i oslobađanje baktericidnih enzima iz oštećenih imunih stanica). Zastoj bakterijskog rasta postoji i prije razvijanja učinkovitog imunološkog odgovora, a kada isti bude u potpunosti razvijen, aktivno rastući bacili bivaju uništeni, dok nereplicirajući bacili odolijevaju uništavanju i preživljavaju (85). Model nadalje ukazuje na ulogu pjenušavih makrofaga koji se pojavljuju tijekom kroničnog upalnog odgovora. Pjenušavi makrofagi fagocitiraju nereplicirajuće bacile *M. tuberculosis* iz izvanstaničnog prostora, koji se unutar aktiviranog makrofaga ne razvijaju, niti bivaju uništeni zahvaljujući neaktivnom stanju bacila (86).

Prema dinamičkom modelu, nereplicirajući bacili unutar pjenušavih makrofaga neprestano se dreniraju prema bronhalnom stablu, dovodeći u osoba koje nemaju rizik od reinfekcije do postupnog uništenja bacila u želudcu, te do usporenog slabljenja latentne infekcije. Zahvaljujući udahnutom zraku neki drenirani nereplicirajući bacili mogu se vratiti u različite dijelove plućnog parenhima i u njima započeti upalni proces koji će dovesti do stvaranja novih granuloma. Ovaj dinamički model podržan je nedavnom norveškom studijom, koja je pokazala da se stopa reaktivacije tuberkuloze postupno

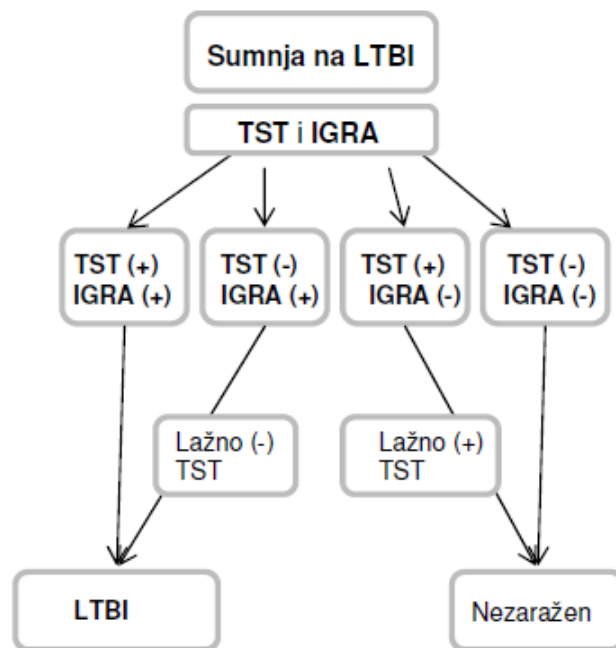
smanjuje tijekom vremena (87). Dinamički model LTBI također nudi objašnjenje o djelotvornosti primjene izoniazida, lijeka koji je učinkovit samo protiv aktivno dijelećih bacila. Kako izoniazid prevenira epizode reinfekcije bacilima oslobođenim iz faze mirovanja, usporenim dreniranjem i uništavanjem nereplicirajućeg bacila u želudcu postupno dolazi do slabljenja latentne infekcije (84).

### **1.3.3. Dijagnostika latentne tuberkulozne infekcije**

Dijagnostika LTBI predstavlja poseban problem, jer za njenu dijagnozu ne postoji zlatni standard. Jedini zlatni standard je rizik kasnijeg razvoja aktivne tuberkuloze, pa je svakako u preventivnim postupcima suzbijanja tuberkuloze nužno pravovremeno dijagnosticirati i adekvatno tretirati osobe s LTBI. Već ranije je naglašeno da će 5-10% odraslih imunokompetentnih osoba s LTBI tijekom života razviti aktivnu tuberkulozu, dok je taj postotak u djece znatno veći. To djelomično ovisi o virulentnosti klice, a većim dijelom o domaćinu: o stanju uhranjenosti, stanju imunološkog sustava i sl. Poznato je da u osoba s LTBI pojedina klinička stanja i neki terapijski postupci značajno pridonose pojavi aktivne tuberkuloze, primjerice AIDS, kronična renalna insuficijencija, maligne bolesti, šećerna bolest, stanje nakon transplantacije organa, kemoterapija, imunosupresivna terapija kortikosteroidima, te antagonistima TNF- $\alpha$ . Do nedavno, tuberkulinski kožni test (eng. *tuberculin skin test*, TST) bio je jedini komercijalno dostupan imunološki test za dijagnozu LTBI, s poznatim ograničenjima u njegovoj primjeni. No, otkrića na području imunologije tuberkuloze pridonijela su razvoju novih dijagnostičkih metoda. S obzirom da infekcija s *M. tuberculosis* snažno utječe na imunološki odgovor koji je posredovan makrofagima i pomoćničkim T-limfocitima, a reguliraju ga IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , mjerenjem koncentracije IFN- $\gamma$  u nadtalogu ili



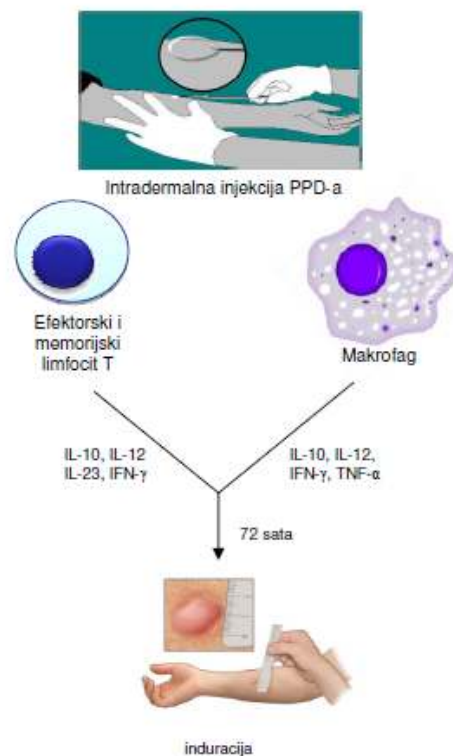
kvantificiranjem učestalosti stanica koje luče IFN- $\gamma$ , može se otkriti inficiranost s *M. tuberculosis*. U osoba u kojih postoji sumnja na moguću pojavu LTBI potrebno je primijeniti testove *in vivo* (TST) i testove *ex vivo* (IGRA-testovi). Interpretacija rezultata tih testova prikazana je na slici 9. Najjednostavnija je interpretacija nalaza kada su oba testa podudarna, bilo da su rezultati oba testa pozitivni ili negativni. Dijagnoza LTBI potvrđena je kad su rezultati oba testa pozitivni, odnosno dijagnoza LTBI je isključena kad su rezultati oba testa negativni. Kod TST-pozitivne/IGRA-negativne nesukladnosti najvjerojatnije se radi o lažno pozitivnom rezultatu TST-a, iako je moguće da se radi o lažno negativnom nalazu IGRA-testa (u tom slučaju LTBI je ipak moguća). Kod TST-negativne/ IGRA-pozitivne nesukladnosti radi o LTBI, a TST je lažno negativan.



**Slika 9.** Dijagnosticiranje LTBI pomoću TST i IGRA

### 1.3.3.1. Tuberkulinski kožni test

Tuberkulinski kožni test je metoda *in vivo* koja se već stotinjak godina koristi u dijagnozi latentne tuberkulozne infekcije. Temelji se na mjerenju reakcije odgođene preosjetljivosti nakon ubrizgavanja slabo definirane smjese mikobakterijskih antigena, PPD-a, pod kožu podlaktice (88). Test se izvodi metodom prema Mantouxu. Na volarnu stranu podlaktice (Slika 10) intradermalno se aplicira 0,1 mL otopine koja sadrži 2 tuberkulinske jedinice PPD-a. U sljedeća dva do tri dana mikobakterijski antigeni potiču memorijske i efektorske limfocite T i makrofage na odgođenu reakciju preosjetljivosti i izlučivanje odgovarajućih interleukina, a veličina induracije na mjestu uštrcavanja PPD-a razmjerna je jačini imunološkog odgovora kompetentnih stanica. Promjer indurata očitava se nakon 72 sata.



**Slika 10.** Mehanizam tuberkuloznoga kožnog testa

Pozitivan nalaz PPD-a može se očekivati ako je prošlo od dva do osam tjedana nakon infekcije *M. tuberculosis*. Na ishod reakcije utječu čimbenici poput BCG-cijepljenja i ranije izloženosti netuberkuloznim mikobakterijama. Budući da otopina PPD-a sadrži više od 200 proteinskih komponenti koje su zajedničke većini mikobakterija, TST može dati lažno pozitivne rezultate u osoba koje su cijepljene BCG-cjepivom ili su bile u kontaktu s netuberkuloznim mikobakterijama (89-91).

Čimbenici koji smanjuju specifičnost testa su subjektivnost pri očitavanju reakcije, različite granične vrijednosti za određivanje pozitivnog TST-a, te sama heterogenost sadržaja PPD-pripravka. U testu se ne koristi pozitivna kontrola, pa su mogući lažno negativni rezultati. Tako je poznato da TST može dati lažno negativan rezultat u određenoj skupini bolesnika s oštećenom ili nezrelom staničnom imunosti, a koji su pod rizikom za razvoj aktivne tuberkuloze, primjerice bolesnici inficirani humanim imunodeficijntnim virusom (HIV), bolesnici s jatrogeno uzrokovanom imunosupresijom, te djeca manje životne dobi (92).

#### **1.3.3.2. Laboratorijska dijagnostika latentne tuberkulozne infekcije**

Posljednjih se godina u području laboratorijske dijagnostike LTBI koriste spoznaje o imunološkom odgovoru organizma na infekciju s mikobakterijem tuberkuloze. Novi pristup temelji se na testovima *ex vivo* iz pune krvi, kojima se određuje koncentracija IFN- $\gamma$  oslobođenog iz limfocita T nakon inkubacije sa specifičnim antigenima za *M. tuberculosis*. Testovi su poznati kao testovi oslobađanja IFN- $\gamma$  (eng. *interferon-gamma release assays*, IGRA). Načelo tih testova je da nakon podražaja sa specifičnim antigenima za *M. tuberculosis* limfociti T oslobađaju IFN- $\gamma$ , čija se koncentracija mjeri

metodom enzimski vezanog imunosorbent testa (ELISA, od eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Specifični antigeni koji se koriste u tim testovima ESAT-6 (eng. *culture filtrate protein-10*), CFP-10 (eng. *culture filtrate protein-10*) i TB7.7(p4) nisu prisutni ni u jednom BCG-soju ni u većini netuberkuloznih mikobakterija osim *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*, *M. flavescens* i *M. gastrii* (93). Time je mogućnost pojave lažno pozitivnih rezultata IGRA-testa svedena na najmanju mjeru budući da limfociti T u zdravih BCG-iranih osoba, neinficiranih osoba i onih inficiranih s većinom netuberkuloznih mikobakterija ne luče IFN- $\gamma$  nakon stimulacije smjesom antigena ESAT-6, CFP-10 i TB7.7 (90, 94-96).

Na tržištu su prisutna dva komercijalna testa: QuantiFERON-TB Gold In Tube (QFT-GIT, Cellestis Ltd, Carnegie, Australija) i T-SPOT.TB (Oxford Immunotec Ltd, Oxford, Velika Britanija). Razlikuju se prema uzorku koji koriste i prema načinu mjerenja oslobođenog IFN- $\gamma$ . QFT-GIT-testovi koriste kao uzorak punu krv i određuju koncentraciju IFN- $\gamma$  metodom ELISA. T-SPOT.TB koristi izolirane limfocite i enzimskom imunospot metodom (eng. *Enzyme-linked immunosorbent spot*, ELISPOT) određuje broj stanica koje izlučuju IFN- $\gamma$ .

Velika prednost IGRA-testova je mogućnost određivanja negativne i pozitivne kontrole. Negativna kontrola daje uvid u količinu IFN- $\gamma$  koji je prisutan u cirkulaciji neovisno o podražajima *ex vivo*. Pozitivna kontrola s mitogenikom fitohemaglutininom koristi se za provjeru sposobnosti limfocita T da na adekvatan podražaj oslobode IFN- $\gamma$ , te za provjeru ispravnosti postupanja s uzorkom kako bi se izbjegli mogući lažno negativni rezultati (97). Naime, poznato je da neki terapijski postupci i neka oboljenja koja oštećuju

funkciju imunološkog sustava potencijalno smanjuju oslobađanje IFN- $\gamma$ , pa primjena pozitivne kontrole sprječava dobivanje lažno negativnih rezultata.

Pozitivna svojstva IGRA-testova su visoka dijagnostička osjetljivost i specifičnost, reproducibilnost, mogućnost standardizacije, a opetovano izvođenje testa nema utjecaj na ishod testa (98). Pai *i sur.* su 2008. godine učinili meta-analizu o primjeni IGRA-testova u dijagnostici LTBI te su ustanovili da je u osoba koje nisu BCG-irane specifičnost QFT-GIT-testa 99%, dok je u BCG-iranih osoba 96%, a osjetljivost se kreće do 78% (99). Nedostaci IGRA-testova su nemogućnost razlikovanja latentnog od aktivnog oblika tuberkulozne infekcije te relativno visoka cijena testa u usporedbi s cijenom TST. Tablica 2 prikazuje neke karakteristike TST-a i IGRA-testova.

**Tablica 2.** Usporedba tuberkulinskoga kožnog testa i određivanja IFN- $\gamma$  *ex vivo* (100).

	<b>Tuberkulinski kožni test</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>
Uzorak	Koža	Periferna krv
Antigen	Smjesa mikobakterijskih antigena	Specifični antigeni mikobakterija tuberkuloze
Stanice	Efektorski i memorijski limfociti T	Efektorski limfociti T
Citokini	IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$ , G-CSF	IFN- $\gamma$
Rezultat	<i>in vivo</i> induracija	<i>ex vivo</i> koncentracija IFN- $\gamma$
Učinak BCG-a	Može dati lažno pozitivan rezultat	Bez učinka
Učinak netuberkuloznih mikobakterija	Mogu dati lažno-pozitivan rezultat	Nema, osim <i>M. kansasii</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. flavescens</i> , <i>M. gastrii</i>
<i>Boosting</i>	Da	Ne
Lažno negativni rezultat	Mogući (imunosuprimirane osobe)	Ne, ako se koristi pozitivna kontrola s mitogenikom
Trajanje pretrage	Najmanje 48 (72) h	najmanje 24 h
Subjektivnost	Da	Ne
Ponovni dolazak	Da	Ne
Oprema	Ne	Da
Razlikovanje aktivna/latentna infekcija	Ne	Ne

Iako se istraživanja o primjeni IGRA-testova u djece još uvijek provode, rezultati su ohrabrujući, te se BCG-iranoj djeci s većom pouzdanošću može dijagnosticirati latentna tuberkuloza. Nacionalne preporuke kao i preporuke stručnih društava za primjenu IGRA-

testova u dijagnostici LTBI značajno se razlikuju (Tablica 3), ali se slažu da će konačna procjena IGRA-testova biti moguća nakon višegodišnje primjene.

**Tablica 3.** Smjernice za dijagnozu tuberkulozne infekcije u djece. Prikazane su smjernice različitih strukovnih i nacionalnih društava (prilagođeno prema ref. 101).

POSTUPAK	SMJERNICE ZA DJECU
PPD	WHO, ECDC, Francuska, Brazil, Slovačka (kod onih koji nisu BCG-irani), Južna Koreja (< 5 god.)
samo PPD (<5 god.); PPD, potom IGRA ako je PPD pozitivan (za djecu od 5-7 god.)	Kanada (za kontakte niskog rizika), Japan, Irska, Amerika-AAP (za djecu > 5 god. IGRA može u potpunosti zamjeniti PPD)
PPD, potom IGRA ako je PPD pozitivan	Njemačka, Italija, Španjolska, Švicarska, Saudijska Arabija, Nizozemska, Bugarska, Slovačka (kod BCG-iranih) te za djecu > 5 god. u Portugalu i Velikoj Britaniji
PPD, potom IGRA ako je PPD negativan	Portugal (< 5 god.) i Velika Britanija (za djecu 2-5 god.)
PPD ili IGRA	Danska, Amerika-CDC (PPD se preporuča za djecu < 5 god.), Južna Koreja (za djecu > 5 god), Finska
PPD i IGRA	Hrvatska, Kanada, Čehoslovačka, Australija
IGRA	Norveška

ECDC - Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti (eng. *European Centre for Disease Prevention and Control*)

Preporuka britanskog Nacionalnog instituta za zdravlje i kliničku izvrsnost (eng. *UK National Institute for Health and Clinical Excellence, NICE*) iz 2010. godine za djecu stariju od pet godina koja su u kontaktu s tuberkuloznim bolesnikom predlaže određivanje LTBI u dvije faze: početno pretraživanje pomoću tuberkulinskog testa te potvrđivanje pozitivnih rezultata nekim od IGR-testova, dok za djecu mlađu od pet

godina u nedostatku adekvatnih studija predlažu da se kod onih s pozitivnim TST-om nakon isključivanja aktivne bolesti preporuča profilaktička terapija, a kod onih s negativnim TST-om za šest tjedana učini neki od IGRA-testova i ponovi TST, te u slučaju pozitivnog testa preporuča kemoprofilaksa (102).

Američki Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (eng. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) u svojim preporukama iz 2010. godine predlaže da se u dijagnostici LTBI, IGRA-testovi koriste umjesto TST-a u svim dobnim skupinama, posebno u osoba koje su primile BCG-cjepivo, osim kod djece mlađe od pet godina, kod kojih se zbog nedostatka adekvatnih studija preporuča TST u kombinaciji s IGRA-testom (103). Američko pedijatrijsko društvo je 2009. godine objavilo da se za sada, u nedostatnosti dovoljnog broja studija u djece mlađe od pet godina ne može preporučiti rutinska primjena IGRA-testova (104). ECDC u svom izvješću iz 2011. godine nije preporučio rutinsku primjenu IGRA-testova kod djece zbog nedostatnosti adekvatnih istraživanja, no navode da je moguća njihova primjena za potvrdu pozitivnih nalaza TST-a, odnosno kod djece koja su primila BCG-cjepivo (105).

Hrvatski Naputak za suzbijanje i sprečavanje tuberkuloze predlaže da sve kontakte s PPD reakcijom promjera  $\geq 10$  mm treba obavezno testirati i IGRA-testom (88).

#### **1.3.4. Liječenje (kemoprofilaksa) latentne tuberkulozne infekcije**

Prema hrvatskom Naputku za suzbijanje i sprečavanje tuberkuloze iz 2010. godine liječenje LTBI u djece provodi se izoniazidom tijekom 6 mjeseci, svakodnevno u dozi od 5 mg/kg (88). Ukoliko je dijete bilo u kontaktu s oboljelim od tuberkuloze rezistentne na izoniazid, tada se kemoprofilaksa LTBI provodi rifampicinom tijekom 4 mjeseca u dozi



od 10 mg/kg. Poznato je da lijekovi koji se koriste 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. U studiji objavljenj 1982. godine utvrđena je 69-93% djelotvornost izoniazida u liječenju LTBI, ovisno o duljini trajanja primjene lijeka (106). Utvrđeno je da duljina trajanja primjene lijeka smanjuje suradljivost u adekvatnom provođenju preporučene kemoprofilakse, te je utvrđena stopa dovršetka primjene izoniazida od 30-64%, što znatno ograničava njegovu djelotvornost (107). Manjoj stopi dovršetka preporučene kemoprofilakse pridonosi i mogućnost izazivanja težih nuspojava, posebno hepatitisa, što dodatno obeshrabruje pacijente i njihove skrbnike u prihvaćanju profilakse (108). S ciljem poboljšanja suradljivosti pacijenata i učinkovitosti kemoprofilakse razvijaju se kraće terapijske sheme (Tablica 4), ali se kod nas još ne preporučavaju u djece s LTBI.

**Tablica 4.** Terapijske sheme liječenja LTBI (prilagođeno prema ref. 109).

TERAPIJA	DJELOTVORNOST (u usporedbi s placebom)
izoniazid 6 mj.	69%
rifampicin 4 mj.	65%
izoniazid 9 mj. *	90%
izoniazid 12 mj. *	93%
izoniazid i rifampicin 3 mj. *	69%
rifampicin i pirazinamid 2 mj. *	90-93%

\* - navedene terapijske sheme nisu u skladu s Nacionalnim nalogom za suzbijanje i sprečavanje tuberkuloze

Upotrebom novijih metoda za dijagnostiku LTBI očekuje se smanjenje potrebe za širokom primjenom preventivne terapije i uvođenje dijagnostičkih kriterija za njenu primjenu. Tijekom provođenja i po završetku preventivne terapije, te u slučajevima kada terapija nije uvedena potrebna su daljnja praćenja i kontrole djeteta u minimalnom razdoblju od dvije godine.

## **2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

Djeca koja su bila u bliskom kontaktu s odraslom osobom u koje su acidorezistentni bacili dokazani bez kultivacije imaju velik rizik pojave LTBI-a. U djece s LTBI mlađe od pet godina rizik razvoja TBC-a dvije godine nakon infekcije iznosi 20 – 40%. Određivanje koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije leukocita s antigenima mikobakterija tuberkuloze omogućuje ispitivanje staničnog imunološkog odgovora u osobe inficirane s *M. tuberculosis*. Budući da su u literaturi podatci o imunološkom odgovoru na infekciju s *M. tuberculosis* oskudni, osnovni cilj bio je procijeniti vrijednost *ex vivo* određivanja koncentracije IFN- $\gamma$  u djece mlađe od pet godina. Postavljeni opći i specifični ciljevi te hipoteza istraživanja su:

### **2.1. Opći ciljevi**

- odrediti vrijednosti IFN- $\gamma$  u djece mlađe od pet godina koja su bila u kontaktu s TBC-bolesnikom, te ustvrditi moguću razliku u vrijednosti IFN- $\gamma$  u serumu djece koja su razvila LTBI i djece koja nisu razvila LTBI
- ispitati postoji li razlika u koncentraciji IFN- $\gamma$  između djece dobi od 1-24 i djece od 25-60 mjeseci

### **2.2. Specifični ciljevi**

- odrediti utjecaj epidemioloških čimbenika na koncentraciju IFN- $\gamma$
- ispitati utjecaj rizika infektivnih indikatora na ishod TST-a i koncentraciju IFN- $\gamma$
- odrediti utjecaj dobi na koncentraciju IFN- $\gamma$
- odrediti podudarnost nalaza IFN- $\gamma$  i rezultata TST-a

- odrediti granične vrijednosti koncentracije IFN- $\gamma$  koji imaju najbolju dijagnostičku vrijednost

### **2.3. Hipoteza:**

- koncentracija oslobođenog IFN- $\gamma$  iz limfocita ovisi o dobi djece
- mjerenje koncentracije IFN- $\gamma$  predstavlja doprinos boljoj, inače problematičnoj dijagnostici LTBI u djece mlađe od pet godina, što smanjuje nepotrebnu kemoprofilaksu

### 3. ISPITANICI I METODE

#### 3.1. Ispitanici

U ispitivanje su uključena djeca u dobi do pet godina, koja su zbog kontakta s bolesnikom oboljelim od TBC-a u razdoblju od siječnja 2011. do svibnja 2012. godine bila upućena u Kliniku za dječje bolesti Zagreb, Klinički bolnički centar „Sestre milosrdnice“ radi ispitivanja moguće infekcije s mikobakterijem tuberkuloze. Sva su djeca u rodilištu primila BCG-cjepivo (atenuirano cjepivo SSI-0.0375 mg *Mycobacterium bovis*, Danish strain 1331, Statens Serum Institute, Copenhagen, Danska).

*Kriteriji uključivanja:* u ispitivanje su uključena djeca do pet godina starosti, bez simptoma akutne bolesti, s dokumentiranom izloženošću bolesniku koji boluje od aktivne TBC. U skladu s hrvatskim Napatkom o suzbijanju i sprečavanju tuberkuloze djeca s LTBI su definirana dokumentiranom izloženošću tuberkuloznom bolesniku, nedostatkom kliničkih znakova aktivne tuberkuloze, pozitivnim nalazom TST-a i pozitivnim IGRA-testom (88). Prema Napatku kontakt se klasificira prema stupnju izloženosti tuberkuloznom bolesniku u tri skupine: a) osobe koje žive u istom domaćinstvu sa zaraznim pacijentom, te osobe koja ne žive u istom kućanstvu, ali redovito i dugo komuniciraju (više od 40 kumulativnih sati) s izvornim pacijentom i na dnevnoj bazi dijele zajednički zrak u prostorijama druženja; b) osobe koje rjeđe provode vrijeme sa zaraznim pacijentom, što uključuje učestale kontakte, prijatelje, rodbinu i školske kolege; c) osobe iz slučajnog kontakta s tuberkuloznim bolesnikom. Prema anamnestičkim podacima koje su davali roditelji, ispitivana skupina djece pripadala je prvim dvjema skupinama, tj. osobama iz redovitoga bliskog kontakta (N=75) i osobama koje su rjeđe

bile u kontaktu s tuberkuloznim bolesnikom (N=46). Trećoj skupini slučajnih kontakata s tuberkuloznim bolesnikom nije pripadalo nijedno dijete uključeno u istraživanje.

*Kriteriji isključivanja:* iz ispitivanja su isključena sva djeca starija od pet godina, imunokompromitirana djeca, djeca s aktivnom tuberkulozom, te djeca s neadekvatno uzetim uzorcima krvi za analizu.

U ispitivanom razdoblju obrađeno je 121 dijete. Prema dobi ispitanici su svrstani u dvije skupine:

Skupina I – djeca u dobi od 1 - 24 mjeseca (N=60), te

Skupina II – djeca u dobi od 25 - 60 mjeseci (N=61).

Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“ odobrilo je istraživanje. U studiju su uključena djeca čiji su roditelji potpisali informirani pristanak. Dijagnostički postupci su provedeni u skladu s Deklaracijom za ljudska prava iz Helsinkija 1975. godine i Seulskim nadopunama iz 2008 (110).

## **3. 2. Metode**

### **3. 2. 1. Metode *in vivo***

#### **3. 2. 1. 1. Tuberkulinski kožni test**

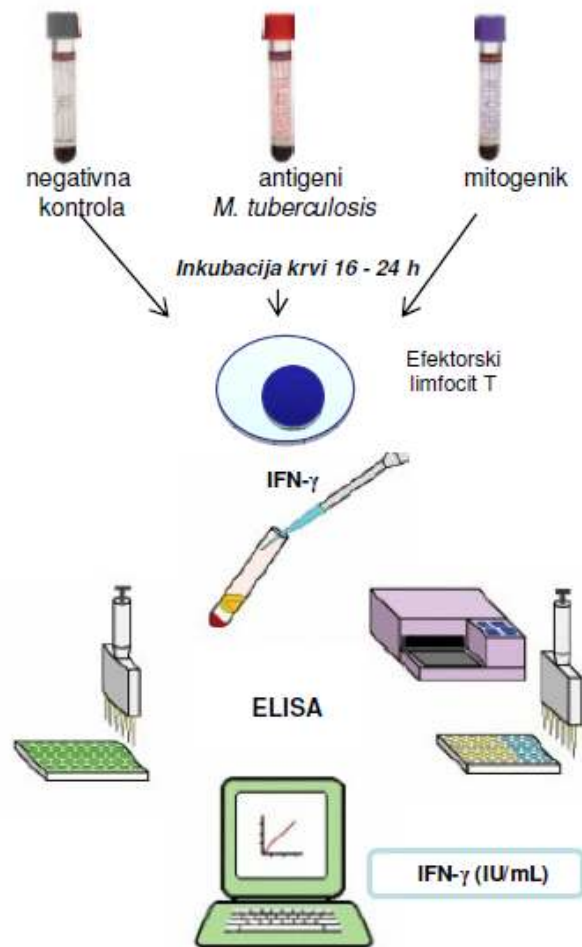
Tuberkulinski kožni test proveden je s 2 jedinice standardizirane otopine PPD-a (Tuberkulin PPD RT23, Statens Serum Institute, Copenhagen, Danska) metodom Mantouxa, a veličina induracije očitavala se nakon 72 sata. Potkožnu aplikaciju PPD-a i očitavanje reakcije provodile su dobro trenirane osobe u skladu s Naputkom za suzbijanje i sprečavanje tuberkuloze. Kriterij očitavanja TST-a prikazan je u tablici 5.

**Tablica 5.** Kriteriji očitavanja tuberkulinskoga kožnog testa za djecu koja su bila u kontaktu s TBC-bolesnikom, te primila BCG-cjepivo

Promjer induracije	Nalaz
$\leq 5$ mm	negativan
6 - 9 mm	upitan, zahtijeva kontrolu
$\geq 10$ mm	pozitivan

### 3. 2. 2. Metode *ex vivo*

Koncentracija IFN- $\gamma$  izmjerena je nakon *ex vivo* postupaka, u kojima je krv pacijenta u kontroliranim uvjetima 22 sata inkubirana s antigenima mikobakterija tuberkuloze (peptidi ESAT-6, CFP-10 i TB7.7). Za to se vrijeme iz efektorskih limfocita T oslobađa IFN- $\gamma$ , čija se koncentracija određuje metodom ELISA (Slika 11). Dakle, nakon uzorkovanja krvi u epruvete sa specifičnim antigenima procedura podrazumijeva dva postupka: a) inkubaciju krvi preko noći, te b) određivanje koncentracije IFN- $\gamma$  (111).



**Slika 11.** Postupak određivanja koncentracije IFN- $\gamma$  (bazična koncentracija, nakon stimulacije antigenima *M. tuberculosis* i nakon stimulacije mitogenikom fitohemaglutininom)

### 3. 2. 2. 1. Uzorkovanje krvi

Za određivanje koncentracije IFN- $\gamma$  uzorkovano je po 1 mL krvi u tri epruvete koje sadrže:

1. specifične antigene mikobakterija tuberkuloze (ESAT-6, CFP10 i TB7.7),
2. mitogenik fitohemaglutinin (pozitivna kontrola) i
3. ne sadrži ni mitogenik ni specifične antigene (negativna kontrola).



### **3. 2. 2. 2. Inkubacija leukocita s antigenima**

Krv je inkubirana preko noći (22 sata) na 37 °C, nakon čega se odvojila plazma, i pohranila na +4 °C do analize.

### **3. 2. 2. 3. Određivanje interferona gama**

Koncentracija IFN- $\gamma$  određivana je metodom ELISA, s pomoću zadnje generacije komercijalnog testa QuantiFERON-TB Gold In Tube (Cellestis Ltd., Carnegie, Australia) prema uputama proizvođača. Rezultati se tumače na temelju granične vrijednosti od 0,35 IU/mL. Vrijednosti  $\geq 0,35$  IU/mL (pozitivan nalaz) ukazuju na infekciju s *M. tuberculosis*, ali ne razlikuju bolest od latentne infekcije. Vrijednosti manje od 0,35 IU/mL (negativan nalaz) ukazuju da je infekcija s *M. tuberculosis* malo vjerojatna. Treća mogućnost je dobivanje neodredivog (eng. indeterminate) rezultata, koji se dobije kada je koncentracija IFN- $\gamma$  u u cirkulaciji povećana (negativna kontrola  $> 8$  IU/mL), te kad je nedovoljan broj limfocita T, odnosno kad je narušena njihova sposobnost da otpuštaju IFN- $\gamma$  na poticaj mitogenikom (pozitivna kontrola  $< 0,5$  IU/mL).

### **3. 2. 3. Statističke metode**

Pohrana podataka i priprema za statističku analizu učinjena je u programu Excel 2000 programskog paketa Microsoft Office (*Microsoft*, Redmond, Washington, SAD). Obrada podataka učinjena je u programu za statističku obradu MedCalc (Medisoftware, Mariakerke, Belgija). Varijable s normalnom raspodjelom opisane su aritmetičkom sredinom ( $\bar{x}$ ) i standardnom devijacijom (SD), a varijable koje nisu slijedile normalnu raspodjelu medijanom (M) i interkvartilnim rasponom (IQR). Za usporedbu zavisnih varijabli koristio se Studentov t-test (za normalnu razdiobu) i Mann-Whitney U test (za

asimetričnu razdiobu). Podudarnost između TST-a i IFN- $\gamma$  testirana je pomoću koeficijenta podudarnosti *kappa* ( $\kappa$ ). Vrijednosti koeficijenta podudarnosti tumače se na slijedeći način:

- $\kappa < 0,4$  označavaju slabu podudarnost,
- $\kappa = 0,4$  do  $0,6$  označavaju dobru podudarnost, a
- $\kappa > 0,6$  označavaju odličnu podudarnost.

Relativan rizik utjecaja pozitivnih prediktora, odnosno indikatora infekcije (bliski kontakt s odraslim tuberkuloznim bolesnikom, pozitivan nalaz kaverni u odraslog bolesnika, pozitivan nalaz acidorezistentnog bacila u sputumu i pozitivan nalaz mikobakterija tuberkuloze u kulturi) na nastanak LTBI određeni su multivarijantnom linearnom regresijskom analizom, a relativan rizik izražen je kao *odds*-omjer (eng. *Odds ratio*, OR). Vrijednost  $OR > 1$ , odražava veći rizik pojave LTBI ako su prisutni indikatori infekcije, a  $OR < 1$  znači da postoji manji rizik pojave LTBI uz prisutnost indikatora infekcije. Korelacija ispitivanih varijabli izražena je Spearman-ovim koeficijentom korelacije (eng. Spearman's coefficient of rank correlation),  $r$ . Vrijednosti koeficijenta korelacije ( $r$ ) tumače se na slijedeći način:

- $r < 0,30$  pokazuje neznatnu međusobnu vezu, bez praktične važnosti,
- $r = 0,30$  do  $0,50$  pokazuje umjerenu vezu, bez praktične važnosti,
- $r = 0,50$  do  $0,70$  pokazuje značajnu vezu koja ima praktičnu važnost,
- $r > 0,70$  pokazuje usku vezu koja ima praktičnu važnost.

ROC-analiza (eng. *Receiver Operating Characteristic Curve*) primjenjena je za izračunavanje dijagnostičke valjanosti rezultata pojedinih testova. Za dobivene ROC-krivulje izračunata je vrijednost površine ispod krivulje AUC (eng. *Area Under Curve*), a

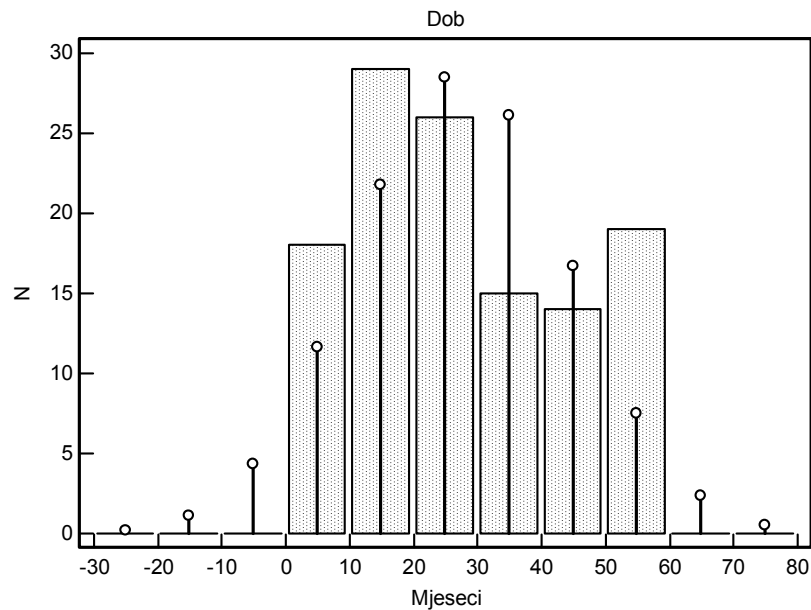
osjetljivost, specifičnost, pozitivna i negativna predvidljiva vrijednost izračunavate su za određenu graničnu vrijednost (eng. *cut off*) nekog rezultata. Statistički značajan odsječak predstavljao je graničnu vrijednost testa koji je imao najveću osjetljivost i najveću specifičnost. Veća površina ispod krivulje ujedno je značila i bolju diskriminacijsku snagu testa. Idealan test, s površinom ispod krivulje 1,0 znači da takav test uopće nema ni lažno pozitivnih ni lažno negativnih rezultata. Dogovoreni sustav vrednovanja razlikovne djelotvornosti podrazumijeva slijedeće vrijednosti za AUC:

- od 0,50 do 0,60 = nedovoljno dobra razlikovna djelotvornost
- od 0,61 do 0,70 = dovoljno dobra razlikovna djelotvornost
- od 0,71 do 0,80 = dobra razlikovna djelotvornost
- od 0,81 do 0,97 = vrlo dobra razlikovna djelotvornost
- od 0,97 do 1,00 = izvrsna razlikovna djelotvornost.

Idealna granična vrijednost testa dobije se povlačenjem tangente na ROC-krivulju u točki koja je najbliža gornjem lijevom uglu površine kvadrata, a predstavlja gornju granicu 95%-tnog referentnog intervala. Statistički značajan odsječak predstavlja graničnu vrijednost testa koji ima najveću osjetljivost i najveću specifičnost. Pozitivna predvidljiva vrijednost predstavlja dio pozitivnih rezultata koji su stvarno pozitivni, a negativna predvidljiva vrijednost onaj dio negativnih rezultata koji su stvarno negativni. Vrijednosti  $p < 0,05$  smatrane su statistički značajnima (112).

#### 4. REZULTATI

Ukupno su analizirani rezultati u 121 djeteta. Djeca su bila u dobi od 1 do 59 mjeseci ( $\bar{x} \pm SD = 28 \pm 17$  mjeseci). Iz histograma razdiobe dobi djece (Slika 12) vidljivo je da je najviše djece bilo u dobi od 10 do 20 mjeseci.



**Slika 12.** Histogram razdiobe djece prema dobi

Ukupno je bilo 60% (72/121) dječaka i 40% (49/121) djevojčica. Iz anamnestičkih podataka utvrđeno je da je od ukupnog broja djece, njih 62% (75/121) bilo iz bliskog kontakta, 38% (46/121) iz udaljenog kontakta s odraslim tuberkuloznim bolesnikom, a niti jedno dijete nije bilo iz treće skupine slučajnih kontakata (Tablica 6). U 31% (38/121) odraslih bolesnika, s kojima su djeca bila u kontaktu, na radiogramu pluća otkrivene su kaverne. Pozitivan nalaz acidorezistentnih bacila u mikroskopskom preparatu imalo je 39% (47/121) odraslih bolesnika, a u 79% (95/121) *M. tuberculosis* je dokazan u kulturi. U bliskom kontaktu s odraslim tuberkuloznim bolesnikom bilo je 58% (35/60) djece u Skupini I, te 66% (40/61) djece u Skupini II. Kod 25% (15/60) djece

Skupine I i 38% (23/61) Skupine II odrasle osobe iz kontakta imale su kaverne u radiogramu pluća. Acidorezistentni bacili u biološkom uzorku odraslih dokazani su u 33% (20/60) djece Skupine I i 44% (27/61) djece Skupine II. Mikobakterij tuberkuloze dokazan je biološkim uzorcima u 72% (43/60) djece mlađe dobne skupine, u odnosu na 85% (52/61) djece starije dobne skupine. Razdioba djece prema indikatorima infektivnosti nije se statistički značajno razlikovala između dviju skupina djece ( $p=0,891$ ).

**Tablica 6.** Indikatori infektivnosti u odraslih osoba. Prikazani su indikatori u djece u dobi 1 do 24 mjeseca (Skupina I) i u djece u dobi od 25 do 60 mjeseci (Skupina II)

<b>Indikatori infektivnosti odraslih</b>	<b>Skupina I (1-24 mj.) N=60 (%)</b>	<b>Skupina II (25-60 mj.) N=61 (%)</b>	<b>Svi (1-60 mj.) N=121 (%)</b>
Bliski kontakt	35 (58)	40 (66)	75 (62%)
Kaverna	15 (25)	23 (38)	38 (31%)
ARB	20 (33)	27 (44)	47 (39%)
Kultura	43 (72)	52 (85)	95 (79%)

ARB – acidorezistentni bacil dokazan u mikroskopskom preparatu

#### **4.1. Tuberkulinski kožni test**

Rezultati TST-a prikazani su u Tablici 7. Pozitivan nalaz imalo je 23% (28/121) djece, a negativan 77% (93/121) djece. U djece koja su bila u bliskom kontaktu s tuberkuloznim bolesnikom TST je bio pozitivan u 89% (25/28) djece. U djece koja su bila u kontaktu s odraslim bolesnikom na čijem su radiogramu dokazane kaverne, TST je bio pozitivan u 86% (24/28) djece. Ako su djeca bila u kontaktu s bolesnicima s mikroskopski dokazanim acidorezistentnim bacilima, 93% (26/28) djece imao je pozitivan TST, a ako je kultivacijom dokazan *M. tuberculosis*, postotak djece s pozitivnim TST-nalazom bio je

100% (28/28). Multivarijantna linearna regresijska analiza ukazala je na značajnost povezanosti između kožnog testa u djece s infektivnim indikatorima (blizina kontakta, kaverne, dokaz acidorezistentnog bacila mikroskopijom, dokaz *M. tuberculosis* kultivacijom). Statistički značajan rizik pozitivnog ishoda TST-a bio najveći u djece koja su bila u kontaktu s bolesnikom s dokazanim *M. tuberculosis* (OR=3,58, rizik 3,58 puta veći,  $p = 0,0002$ ), zatim u djece s bliskim kontaktom s bolesnikom (OR = 1,93; rizik 1,93 puta veći,  $p = 0,047$ ).

**Tablica 7.** Rezultati multivarijantne linearne regresijske analize povezanosti ishoda TST-a u djece i infektivnih indikatora odraslih osoba

Ispitanici N=121	INDIKATORI INFEKTIVNOSTI			
	Bliski kontakt N=75 (62%)	Kaverne N=38 (31%)	ARB N=47 (39%)	Kultura N=95 (79%)
poz. TST N=28	25/28 (89%)	24/28 (86%)	26/28 (93%)	28/28 (100%)
neg. TST N=93	43/93 (46%)	79/93 (85%)	72/93 (77%)	26/93 (28%)
OR	1,93	1,01	1,20	3,58
95% CI	1,01 – 3,70	0,54 – 1,88	0,65 – 2,22	1,81– 7,07
p	<b>0,047</b>	0,977	0,563	<b>0,0002</b>

ARB = acidorezistentni bacil; OR = indeks rizika; CI = interval pouzdanosti;

#### 4.2. Određivanje IFN- $\gamma$

Rezultati određivanja IFN- $\gamma$  prikazani su u Tablici 8. Pozitivan nalaz imalo je 21% (26/121) djece, a negativan 78% (95/121) djece. U djece koja su bila u bliskom kontaktu s tuberkuloznim bolesnikom IFN- $\gamma$  je bio pozitivan u 92% (24/26) djece. U djece koja su

bila u kontaktu s odraslim bolesnikom na čijem su radiogramu dokazane kaverne IFN- $\gamma$  bio je pozitivan u 96% (25/26) djece. Ako su djeca bila u kontaktu s bolesnicima s dokazanim acidorezistentnim bacilima 96% (25/26) djece imao je pozitivan IFN- $\gamma$ , a ako je dokazan *M. tuberculosis* sva su djeca imala pozitivan nalaz IFN- $\gamma$  (26/26). Multivarijantna linearna regresijska analiza ukazala je na značajnost povezanosti između ishoda rezultata IFN- $\gamma$  u djece s infektivnim indikatorima (blizina kontakta, kaverne, dokaz acidorezistentnog bacila, dokaz *M. tuberculosis*). Statistički značajan rizik pozitivnog ishoda IFN- $\gamma$  bio je najveći u djece koja su bila u kontaktu s bolesnikom s dokazanim *M. tuberculosis* (OR=3,65, rizik 3,65 puta veći, p = 0,0003), zatim u djece s bliskim kontaktom s bolesnikom (OR = 1,99; rizik 1,99 puta veći, p = 0,041).

**Tablica 8.** Rezultati multivarijantne linearne regresijske analize povezanosti ishoda rezultata IFN- $\gamma$  u djece i infektivnih indikatora u odraslih osoba

Ispitanici 1-60 mjeseci N=121	INDIKATORI INFEKTIVNOSTI			
	Bliski kontakt N=75 (62%)	Kaverne N=38 (31%)	ARB N=47 (39%)	Kultura N=95 (79%)
Poz. IFN- $\gamma$ N=26	24/26 (92%)	25/26 (96%)	25/26 (96%)	26/26 (100%)
Neg. IFN- $\gamma$ N=95	44/95 (46%)	82/95 (86%)	73/95 (77%)	26/95 (27%)
OR	1,99	1,11	1,25	3,65
95% CI	1,03 – 3,86	0,60 – 2,0780	0,67 – 2,35	1,82 – 7,33
p	<b>0,041</b>	0,734	0,484	<b>0,0003</b>

ARB = acidorezistentni bacil; OR = indeks rizika; CI = interval pouzdanosti;

### 4.3. Rezultati sukladnosti tuberkulinskog kožnog testa i IFN- $\gamma$

Sukladnost rezultata TST-a i IFN- $\gamma$  za ukupne ispitanike prikazana je u Tablici 9. Multivarijantna linearna regresijska analiza ukazala je na značajnost povezanosti sukladnosti rezultata TST-a i IFN- $\gamma$  u djece s infektivnim indikatorima (blizina kontakta, kaverne, dokaz acidorezistentnog bacila, dokaz *M. tuberculosis*). Statistički značajan rizik pozitivnog ishoda oba testa bio je najveći u djece koja su bila u kontaktu s bolesnikom s dokazanim kavernama na radiogramu pluća (OR=13,38, rizik 13,38 puta veći,  $p < 0,0001$ ), zatim u djece koja su bila u kontaktu s bolesnikom s dokazanim acidorezistentnim bacilima u iskašljaju (OR=6,18, rizik 6,18 puta veći,  $p = 0,0001$ ).

**Tablica 9.** Rezultati multivarijantne linearne regresijske analize povezanosti ishoda sukladnih rezultata TST-a i IFN- $\gamma$  u djece Skupine I i infektivnih indikatora odraslih osoba

Ispitanici 1-60 mjeseci N=121	INDIKATORI INFEKTIVNOSTI			
	Bliski kontakt N=75 (62%)	Kaverne N=38 (31%)	ARB N=47 (39%)	Kultura N=95 (79%)
Poz. IFN- $\gamma$ /poz.TST	18/18 (100%)	17/18 (94%)	17/18 (94%)	18/18 (100%)
Neg. IFN- $\gamma$ /neg.TST	44/85 (52%)	6/85 (7%)	13/85 (15%)	59/85 (70%)
OR	2,00	13,38	6,18	1,44
95% CI	0,91 – 4,08	4,63 – 38,64	2,55 – 14,94	0,69 – 3,00
p	0,084	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0001</b>	0,329

ARB = acidorezistentni bacil; OR = indeks rizika; CI = interval pouzdanosti;



#### **4.4. Rezultati u skupini I**

U Skupini I je bilo 65% (39/60) dječaka i 35% (21/60) djevojčica. Od ukupnog broja djece iz ove skupine, 58% (35/60) je bilo iz bliskog kontakta, a 42% (25/60) iz udaljenog kontakta. Kod 25% (15/60) odraslih bolesnika, s kojima su djeca bila u kontaktu, na radiogramu pluća otkrivene su kaverne. Pozitivan nalaz acidorezistentnih bacila u mikroskopskom preparatu imalo je 33% (20/60) odraslih, a kod 72% (43/60) dokazan je *M. tuberculosis* u kulturi.

##### **4.4.1. Rezultati tuberkulinskoga kožnog testa**

Na Tablici 10. prikazana je razdioba pozitivnih i negativnih nalaza TST-a u odnosu na indekse infektivnosti (bliski kontakt, kaverne, nalaz AFB-a i kulture) u djece u dobi od 1 do 24 mjeseca (Skupina I). Pozitivan nalaz imalo je 18% (11/60) djece, a negativan 82% (49/60) djece. U djece koja su bila u bliskom kontaktu s tuberkuloznim bolesnikom TST je bio pozitivan u 91% (10/11) djece. U djece koja su bila u kontaktu s odraslim bolesnikom na čijem su radiogramu dokazane kaverne TST je bio pozitivan u 91% (10/11) djece. Ako su djeca bila u kontaktu s bolesnicima s dokazanim acidorezistentnim bacilima 91% (10/11) djece imalo je pozitivan TST, a ako je dokazan *M. tuberculosis* postotak djece s pozitivnim TST-nalazom bio je 100%. Multivarijantna linearna regresijska analiza ukazala je na značajnost povezanosti između kožnog testa u djece s infektivnim indikatorima (kaverne, dokaz acidorezistentnog bacila, dokaz *M. tuberculosis*). Statistički značajan rizik pozitivnog ishoda TST-a bio je najveći u djece koja su bila u kontaktu s bolesnikom s dokazanim *M. tuberculosis* (OR=2,88, rizik 2,88 puta veći,  $p = 0,038$ ).

**Tablica 10.** Rezultati multivarijantne linearne regresijske analize povezanosti ishoda rezultata TST-a djece Skupine I i infektivnih indikatora odraslih osoba

Ispitanici 1-24 mjeseca N=60	INDIKATORI INFEKTIVNOSTI			
	Bliski kontakt N=35 (58%)	Kaverne N=15 (25%)	ARB N=20 (33%)	Kultura N=43 (72%)
Poz. TST N=11	10/11 (91%)	10/11 (91%)	10/11 (91%)	11/11 (100%)
Neg. TST N=49	24/49 (49%)	44/49 (90%)	39/49 (80%)	17/49 (35%)
OR	1,86	1,01	1,14	2,88
95% CI	0,69 – 4,97	0,39 – 2,61	0,44 – 2,97	1,06 – 7,85
p	0,219	0,980	0,785	<b>0,038</b>

ARB = acidorezistentni bacil; OR = indeks rizika; CI = interval pouzdanosti;

#### 4.4.2. Određivanje IFN- $\gamma$

Rezultati određivanja IFN- $\gamma$  prikazani su u Tablici 11. Pozitivan nalaz imalo je 15% (9/60) djece, a negativan 85% (51/60) djece. U djece koja su bila u bliskom kontaktu s tuberkuloznim bolesnikom IFN- $\gamma$  je bio pozitivan u 89% (8/9) djece. U djece koja su bila u kontaktu s odraslim bolesnikom na čijem su radiogramu dokazane kaverne IFN- $\gamma$  je bio pozitivan u 89% (8/9) djece. Ako su djeca bila u kontaktu s bolesnicima s dokazanim acidorezistentnim bacilima, 89% (8/9) djece imalo je pozitivan IFN- $\gamma$ , a ako je dokazan *M. tuberculosis* sva su djeca (11/11) imala pozitivan nalaz IFN- $\gamma$ . Multivarijantna linearna regresijska analiza ukazala je na značajnost povezanosti između ishoda rezultata IFN- $\gamma$  u djece s infektivnim indikatorima (kaverne, dokaz acidorezistentnog bacila, dokaz *M. tuberculosis*). Statistički značajan rizik pozitivnog ishoda IFN- $\gamma$  bio je najveći u djece

koja su bila u kontaktu s bolesnikom u kojeg je dokazan *M. tuberculosis* (OR=3,00, rizik 3,00 puta veći, p = 0,045).

**Tablica 11.** Rezultati multivarijantne linearne regresijske analize povezanosti ishoda rezultata IFN- $\gamma$  u djece Skupine I i infektivnih indikatora odraslih osoba

Ispitanici 1-24 mjeseca N=60	INDIKATORI INFEKTIVNOSTI			
	Bliski kontakt N=35 (58%)	Kaverne N=15 (25%)	ARB N=20 (33%)	Kultura N=43 (72%)
Poz. IFN- $\gamma$ N=9	8/9 (89%)	8/9 (89%)	8/9 (89%)	9/9 (100%)
Neg. IFN- $\gamma$ N=51	24/51 (47%)	44/51 (86%)	39/51 (77%)	17/51 (33%)
OR	1,89	1,03	1,16	3,00
95% CI	0,65 – 5,50	0,37 – 2,90	0,41 – 3,29	1,02 – 8,79
p	0,244	0,955	0,777	<b>0,045</b>

ARB = acidorezistentni bacil; OR = indeks rizika; CI = interval pouzdanosti;

#### 4.4.3. Rezultati sukladnosti tuberkulinskog kožnog testa i IFN- $\gamma$

Sukladnost rezultata TST-a i IFN- $\gamma$  za ispitanike Skupine I prikazana je u Tablici 12. Multivarijantna linearna regresijska analiza ukazala je na značajnost povezanosti između TST-a i IFN- $\gamma$  u djece s infektivnim indikatorima (blizina kontakta, kaverne, dokaz acidorezistentnog bacila, dokaz *M. tuberculosis*). Statistički značajan rizik pozitivnog ishoda oba testa bio je najveći u djece koja su bila u kontaktu s bolesnikom s dokazanim kavernama na rentgenogramu pluća (OR=19,17, rizik 19,17 puta veći, p = 0,002), zatim u

djece koja su bila u kontaktu s bolesnikom s dokazanim acidorezistentnim bacilima u iskašljaju (OR=5,48, rizik 5,48 puta veći, p = 0,020).

**Tablica 12.** Rezultati multivarijantne linearne regresijske analize povezanosti ishoda sukladnih rezultata TST-a i IFN- $\gamma$  u djece Skupine I i infektivnih indikatora odraslih osoba

Ispitanici 1-24 mjeseca N=60	INDIKATORI INFEKTIVNOSTI			
	Bliski kontakt N=35 (58%)	Kaverne N=15 (25%)	ARB N=20 (33%)	Kultura N=43 (72%)
Poz. IFN- $\gamma$ /poz.TST N=6	6/6 (100%)	5/6 (83%)	5/6 (83%)	6/6 (100%)
Neg. IFN- $\gamma$ /neg.TST N=46	23/46 (50%)	2/46 (4%)	7/46 (15%)	29/46 (63%)
OR	2,00	19,17	5,48	1,59
95% CI	0,58 – 6,89	3,02 – 121,58	1,31 – 22,85	0,47 – 5,39
p	0,272	<b>0,002</b>	<b>0,020</b>	0,460

ARB = acidorezistentni bacil; OR = indeks rizika; CI = interval pouzdanosti;

#### 4.5. Rezultati u skupini II

U Skupini II je bilo 54% (33/61) dječaka i 46% (28/61) djevojčica. Od ukupnog broja djece iz ove skupine, 66% (40/61) je bilo iz bliskog kontakta, a 34% (21/61) iz udaljenog kontakta. Kod 38% (23/61) odraslih bolesnika, s kojima su djeca bila u kontaktu, na radiogramu pluća otkrivene su kaverne. Pozitivan nalaz acidorezistentnih bacila u

mikroskopskom preparatu imalo je 44% (27/61) odraslih, a u 85% (52/61) dokazan je *M. tuberculosis* u kulturi.

#### **4.5.1. Rezultati tuberkulinskoga kožnog testa**

Na Tablici 13. prikazana je razdioba pozitivnih i negativnih nalaza TST-a u odnosu na indekse infektivnosti (bliski kontakt, kaverne, nalaz AFB-a i kulture) u djece u dobi od 25 do 60 mjeseci (Skupina II).

Pozitivan nalaz imalo je 28% (17/61) djece, a negativan 72% (44/61) djece. U djece koja su bila u bliskom kontaktu s tuberkuloznim bolesnikom TST je bio pozitivan u 88% (15/17) djece. U djece koja su bila u kontaktu s odraslim bolesnikom na čijem su radiogramu dokazane kaverne, TST je bio pozitivan u 82% (14/17) djece. Ako su djeca bila u kontaktu s bolesnicima s dokazanim acidorezistentnim bacilima 94% (16/17) djece imao je pozitivan TST, a ako je dokazan *M. tuberculosis* postotak djece s pozitivnim TST-nalazom bio je 100% (17/17). Multivarijantna linearna regresijska analiza ukazala je na značajnost povezanosti između kožnog testa u djece s infektivnim indikatorima (blizina kontakta, kaverne, dokaz acidorezistentnog bacila, dokaz *M. tuberculosis*). Statistički značajan rizik pozitivnog ishoda TST-a bio je najveći u djece koja su bila u kontaktu s bolesnikom s dokazanim *M. tuberculosis* (OR=4,89, rizik 4,89 puta veći,  $p = 0,002$ ).

**Tablica 13.** Rezultati multivarijantne linearne regresijske analize povezanosti ishoda rezultata TST-a djece Skupine II i infektivnih indikatora odraslih osoba

Ispitanici 25-60 mjeseci N=61	INDIKATORI INFEKTIVNOSTI			
	Bliski kontakt N=40 (66%)	Kaverne N=23 (38%)	ARB N=27 (44%)	Kultura N=52 (85%)
poz. TST N=17	15/17 (88%)	14/17 (82%)	16/17 (94%)	17/17 (100%)
neg. TST N=44	19/44 (43%)	35/44 (80%)	33/44 (75%)	9/44 (21%)
OR	2,04	1,04	1,26	4,89
95% CI	0,85 – 4,92	0,45 – 2,39	0,56 – 2,85	1,83 – 13,06
p	0,111	0,935	0,587	<b>0,002</b>

ARB = acidorezistentni bacil; OR = indeks rizika; CI = interval pouzdanosti;

#### 4.5.2. Određivanje IFN- $\gamma$

Rezultati određivanja IFN- $\gamma$  u djece dobi od 25-60 mjeseci prikazani su u Tablici 14. Pozitivan nalaz imalo je 28% (17/61) djece, a negativan 72% (44/61) djece. U djece koja su bila u bliskom kontaktu s tuberkuloznim bolesnikom IFN- $\gamma$  je bio pozitivan u 94% (16/17) djece. U djece koja su bila u kontaktu s odraslim bolesnikom na čijem su radiogramu dokazane kaverne IFN- $\gamma$  je bio pozitivan u 100% (17/17) djece. Ako su djeca bila u kontaktu s bolesnicima s dokazanim acidorezistentnim bacilima 100% (17/17) djece imao je pozitivan IFN- $\gamma$ , kao i ako je dokazan *M. tuberculosis*. Multivarijantna linearna regresijska analiza ukazala je na značajnost povezanosti između ishoda rezultata IFN- $\gamma$  u djece s infektivnim indikatorima (blizina kontakta, kaverne, dokaz acidorezistentnog bacila, dokaz *M. tuberculosis*). Statistički značajan rizik pozitivnog

ishoda IFN- $\gamma$  bio je najveći u djece koja su bila u kontaktu s bolesnikom u kojeg je dokazan *M. tuberculosis* (OR=4,89, rizik 4,89 puta veći, p = 0,002).

**Tablica 14.** Rezultati multivarijantne linearne regresijske analize povezanosti ishoda rezultata IFN- $\gamma$  u djece Skupine II i infektivnih indikatora odraslih osoba

Ispitanici 25-60 mjeseci N=61	INDIKATORI INFEKTIVNOSTI			
	Bliski kontakt N=40 (66%)	Kaverne N=23 (38%)	ARB N=27 (44%)	Kultura N=52 (85%)
Poz. IFN- $\gamma$ N=17	16/17 (94%)	17/17 (100%)	17/17 (100%)	17/17 (100%)
Neg. IFN- $\gamma$ N=44	20/44 (45%)	38/44 (86%)	34/44 (77%)	9/44 (20%)
OR	2,07	1,16	1,29	4,89
95% CI	0,87 – 4,91	0,52 – 2,58	0,58 – 2,90	1,83 – 13,06
p	0,099	0,720	0,532	<b>0,002</b>

ARB = acidorezistentni bacil; OR = indeks rizika; CI = interval pouzdanosti;

#### 4.5.3. Rezultati sukladnosti tuberkulinskog kožnog testa i IFN- $\gamma$

Sukladnost rezultata TST-a i IFN- $\gamma$  za ispitanike Skupine II prikazana je u Tablici 15. Multivarijantna linearna regresijska analiza ukazala je na značajnost povezanosti između TST-a i IFN- $\gamma$  u djece s infektivnim indikatorima (blizina kontakta, kaverne, dokaz acidorezistentnog bacila, dokaz *M. tuberculosis*). Statistički značajan rizik pozitivnog ishoda oba testa bio je najveći u djece koja su bila u kontaktu s bolesnikom s dokazanim kavernama na radiogramu pluća (OR=9,75, rizik 9,75 puta veći, p = 0,001), zatim u djece

koja su bila u kontaktu s bolesnikom s dokazanim acidorezistentnim bacilima u iskašljaju (OR=6,50, rizik 6,50 puta veći, p = 0,002).

**Tablica 15.** Rezultati multivarijantne linearne regresijske analize povezanosti ishoda sukladnih rezultata TST-a i IFN- $\gamma$  u djece Skupine II i infektivnih indikatora odraslih osoba

Ispitanici 25-60 mjeseci N=61	INDIKATORI INFEKTIVNOSTI			
	Bliski kontakt N=40 (66%)	Kaverne N=23 (38%)	ARB N=27 (44%)	Kultura N=52 (85%)
Poz. IFN- $\gamma$ /poz.TST N=12	12/12 (100%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)	12/12 (100%)
Neg. IFN- $\gamma$ /neg. TST N=39	21/39 (54%)	4/39 (10%)	6/39 (15%)	30/39 (77%)
OR	1,86	9,75	6,50	1,30
95% CI	0,71 – 4,85	2,65 – 35,90	2,01 – 21,03	0,512 – 3,30
p	0,206	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>	0,581

ARB = acidorezistentni bacil; OR = indeks rizika; CI = interval pouzdanosti;

#### 4.6. Sukladnost između tuberkulinskoga kožnog testa i interferona gama

Na temelju podataka iz Slike 13, koja prikazuje udio pozitivnih i negativnih nalaza TST-a i IFN- $\gamma$  izračunata je sukladnost između TST-a i IFN- $\gamma$ , a rezultati su prikazani na Tablici 16.





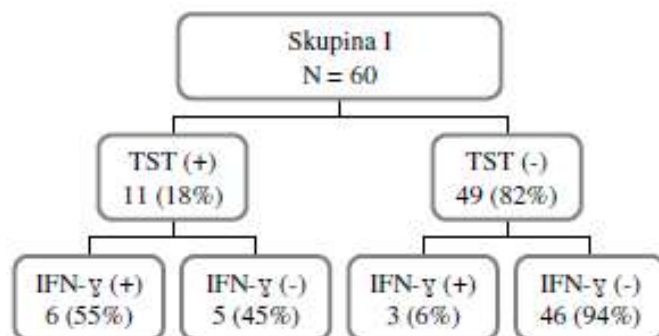
**Slika 13.** Pregled pozitivnih i negativnih rezultata TST-a i IFN- $\gamma$  u djece dobi 1-60 mj. (N=121)

TST-pozitivan/IFN- $\gamma$ -pozitivan nalaz imalo je 15% (18/121) djece, TST-negativan/IFN- $\gamma$ -negativan imalo je 70% (85/121) djece, TST-pozitivan/IFN- $\gamma$ -negativan imalo je 8% (10/121) djece, a TST-negativan/IFN- $\gamma$ -pozitivan rezultat postojao je u 7% (8/121) djece. Ukupna sukladnost (pozitivna i negativna) postojala je u 85% (103/121) djece, a koeficijent sukladnosti,  $\kappa$ , iznosio je 0,588, što podrazumijeva dobru sukladnost.

**Tablica 16.** Sukladnost između TST-a i IFN- $\gamma$  u ispitivane djece. Prikazani su rezultati u sve djece i u djece svrstane prema spolu

Test		Djeca N = 121	Muški N = 72	Ženski N = 49
TST/ IFN- $\gamma$	$\kappa$	0,588	0,513	0,672
pozitivan/pozitivan	N (%)	18 (15)	11 (15)	7 (14)
negativan/negativan	N (%)	85 (70)	48 (67)	37 (76)
pozitivan/ negativan	N (%)	10 (8)	8 (11)	2 (4)
negativan/pozitivan	N (%)	8 (7)	5 (7)	3 (6)

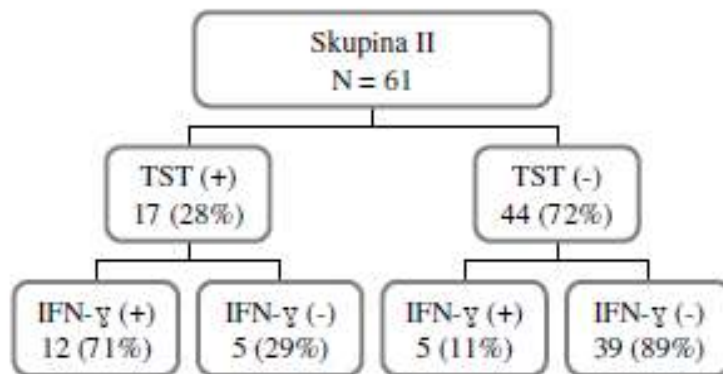
Iz podataka iz Slike 14 izračunata je sukladnost između TST-a i IFN- $\gamma$  za djecu Skupine I.



**Slika 14.** Pregled pozitivnih i negativnih rezultata TST-a i IFN- $\gamma$  u djece dobi od 1-24 mjeseca (Skupina I).

U djece Skupine I (Tablica 17) oba su testa bila pozitivna u 10% (6/60) djece, a negativna u 77% (46/60) djece, a ukupna sukladnost iznosila je 87% (52/60). TST-pozitivan/IFN- $\gamma$  -negativan imalo je 8% (5/60) djece, a TST-negativan/IFN- $\gamma$  -pozitivan rezultat postojao je u 5% (3/60) djece. Ukupna sukladnost (pozitivna i negativna) postojala je u 87% djece, a koeficijent sukladnosti,  $\kappa = 0,521$  ukazao je da među testovima postoji dobra sukladnost.

Na temelju podataka iz slike 15 izračunata je sukladnost između TST-a i IFN- $\gamma$  za djecu dobi od 25-60 mjeseci (Skupina II).



**Slika 15.** Pregled pozitivnih i negativnih rezultata TST-a i IFN- $\gamma$  u djece dobi od 25-60 mjeseci (Skupina II).

U djece Skupine II (Tablica 17) oba su testa bila pozitivna u 20% (12/61) djece, a negativna u 64% (39/61) djece, a ukupna sukladnost iznosila je 84% (51/61). TST-pozitivan/ IFN- $\gamma$ -negativan imalo je 8% (5/61) djece, a TST-negativan/IFN- $\gamma$ -pozitivan rezultat postojao je u 8% (5/61) djece. Ukupna sukladnost (pozitivna i negativna) postojala je u 84% (51/61) djece, a koeficijent sukladnosti iznosio je  $\kappa = 0,592$ , što znači da je postojala dobra sukladnost.

**Tablica 17.** Sukladnost između TST-a i IFN- $\gamma$  u djece u dobi od 1-24 mjeseca (Skupina I) i djece u dobi od 25-60 mjeseci (Skupina II)

Test		Skupina I N = 60	Skupina II N = 61
TST/ IFN- $\gamma$	$\kappa$	0,521	0,592
pozitivan/pozitivan	N (%)	6 (10)	12 (20)
negativan/negativan	N (%)	46 (77)	39 (64)
pozitivan/ negativan	N (%)	5 (8)	5 (8)
negativan/pozitivan	N (%)	3 (5)	5 (8)

Što se tiče indikatora infektivnosti (bliski kontakt, kaverne, nalaz acidorezistentnog bacila, nalaz *M. tuberculosis* u kulturi), iz Tablice 18, može se vidjeti da je odlična sukladnost TST-a i IFN- $\gamma$  ( $\kappa = 0,606$ ) postojala u djece koja su bila u bliskom kontaktu s odraslim tuberkuloznim bolesnikom. U njih su oba testa bila pozitivna u 24% (18/75) djece, a negativna u 59% (44/75) djece, a ukupna sukladnost iznosila je 83% (62/75). TST-  
pozitivan/IFN- $\gamma$ -negativan imalo je 9% (7/75) djece, a TST-negativan/IFN- $\gamma$ -pozitivan rezultat postojao je u 8% (6/75) djece. Dobra sukladnost ( $\kappa = 0,535$ ) postojala je u djece koja su bila u kontaktu s odraslim osobama s pozitivnim nalazom *M. tuberculosis* u kulturi, uz ukupnu sukladnost (pozitivna u 19% (18/95) i negativna u 62% (59/95)) u 81% (77/95) djece. Slaba sukladnost postojala je u djece kod kojih su osobe iz kontakta imale pozitivan nalaz acidorezistentnih bacila ( $\kappa = 0,272$ ), odnosno ako je u odrasle osobe postojao nalaz kaverni na radiogramu pluća ( $\kappa = 0,139$ ).

**Tablica 18.** Sukladnost između TST-a i IFN- $\gamma$  u djece prema indeksu infektivnosti (bliski kontakt, kaverne, nalaz acidorezistentnog bacila, nalaz *M. tuberculosis* u kulturi)

Test		INDIKATORI INFEKTIVNOSTI			
		Bliski kontakt N = 75	Kaverne N = 38	Nalaz ARB N = 47	Kultura N = 95
TST/IFN- $\gamma$	$\kappa$	0,606	0,139	0,272	0,535
Pozitivan/pozitivan	N (%)	18 (24)	17 (45)	17 (36)	18 (19)
Negativan/negativan	N (%)	44 (59)	6 (16)	13 (28)	59 (62)
Pozitivan/ negativan	N (%)	7 (9)	7 (18)	9 (19)	10 (11)
Negativan/pozitivan	N (%)	6 (8)	8 (21)	8 (17)	8 (8)

#### 4.7. Sposobnost otpuštanja IFN- $\gamma$ iz leukocita

Određivanjem koncentracije IFN- $\gamma$  u plazmi bez stimulacije leukocita mitogenom određena je njegova bazična koncentracija, a određivanjem IFN- $\gamma$  u plazmi nakon stimulacije s fitohemaglutininom ispitana je sposobnost leukocita da na poticaj ovim mitogenikom izlučuju IFN- $\gamma$ . Vrijednosti su prikazane u Tablici 19. Bazična koncentracija IFN- $\gamma$  u plazmi (krv uzorkovana s heparinom) bila je u rasponu od 0,02 – 0,24 IU/mL. Vrijednosti medijana i interkvartilne vrijednosti iznosile su [M(IQR) = 0,08(0,05-0,11)] IU/mL. Koncentracija IFN- $\gamma$  u plazmi nakon stimulacije leukocita s fitohemaglutininom bila je u rasponu od 0,93 – 27,59 IU/mL, a prosječna koncentracija iznosila je ( $\bar{x} \pm SD = 11,26 \pm 5,81$ ) IU/mL. Razlika u koncentraciji prije stimulacije i nakon stimulacije mitogenikom bila je statistički značajna,  $p < 0,0001$ .

**Tablica 19.** Koncentracija IFN- $\gamma$  u plazmi djece (N=121) bez stimulacije i nakon stimulacije s mitogenikom fitohemaglutininom

Ispitanici (N=121)	IFN- $\gamma$ (IU/mL)	
	Bazična koncentracija	Nakon stimulacije mitogenom *
M(IQR)	0,08(0,05 - 0,11)	–
95% CI	0,07 - 0,09	–
$\bar{x} \pm SD$	–	11,26 $\pm$ 5,81
95% CI	–	10,22 - 12,31

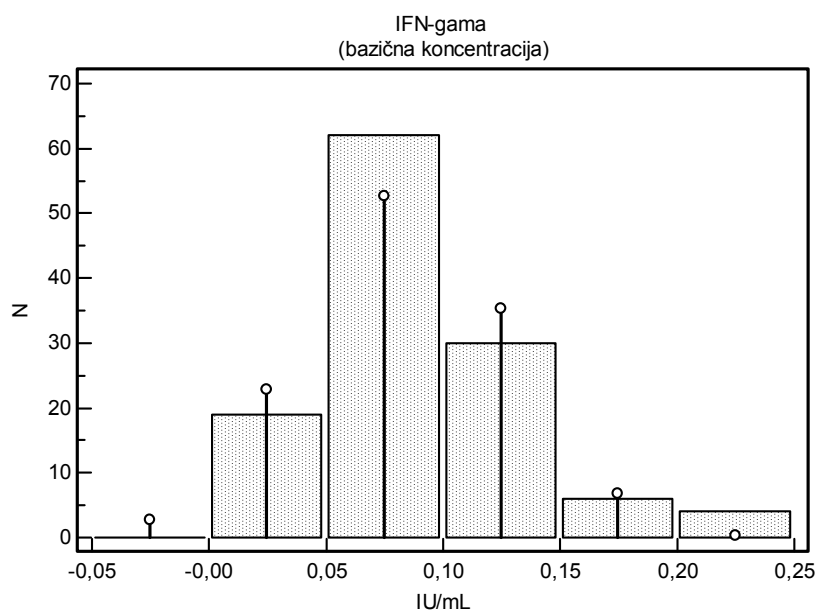
\* p < 0,0001

M – medijan, IQR – interkvartilni raspon,  $\bar{x}$  – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija, 95% CI – 95%-tni interval pouzdanosti

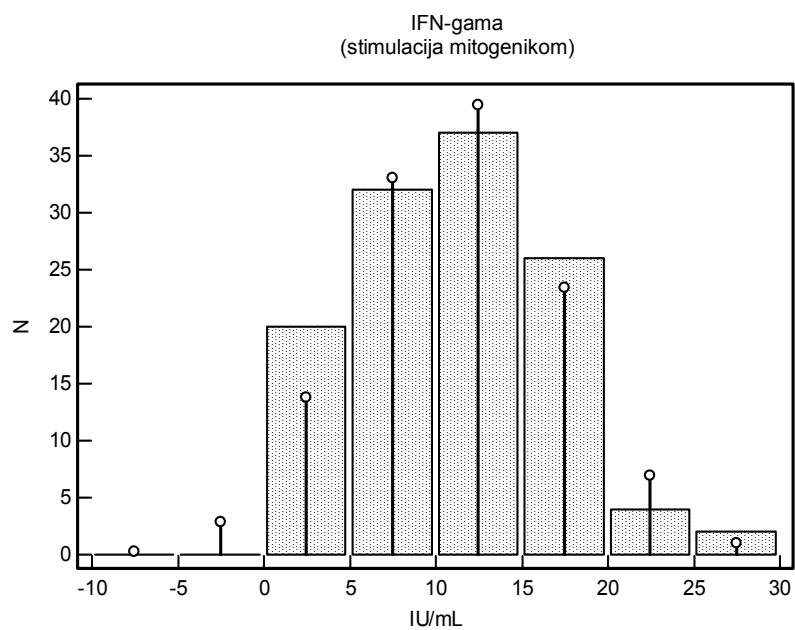
Budući da nijedno dijete nije imalo bazičnu koncentraciju IFN- $\gamma$  veću od 8,0 IU/mL (Tablica 19), moglo se zaključiti da u ispitivane djece nije bilo nespecifične stimulacije otpuštanja IFN- $\gamma$  iz leukocita. Nakon stimulacije mitogenikom nije bilo djece s koncentracijom IFN- $\gamma$  manjom od 0,5 IU/L, što znači da su leukociti u svih ispitanika imali sposobnost izlučivanja IFN- $\gamma$  na poticaj fitohemaglutininom.

Bazična koncentracija IFN- $\gamma$  u 50% djece bila je u rasponu od 0,02 do 0,08 IU/L, a u 50% djece u rasponu od 0,08 do 0,24 IU/L. Iz histograma razdiobe rezultata (Slika 16A) vidljivo je da je najviše djece imalo koncentraciju IFN- $\gamma$  u rasponu 0,05 do 0,10 IU/mL. Nakon poticaja s mitogenikom koncentracija IFN- $\gamma$  bila je u 50% djece u rasponu od 0,93 - 11,27 IU/mL, a u 50% djece u rasponu od 11,27 do 27,59 IU/mL. Najveći broj djece imao je koncentraciju IFN- $\gamma$  u rasponu 10,0 do 15,0 IU/mL (Slika 16B).

**A**



**B**

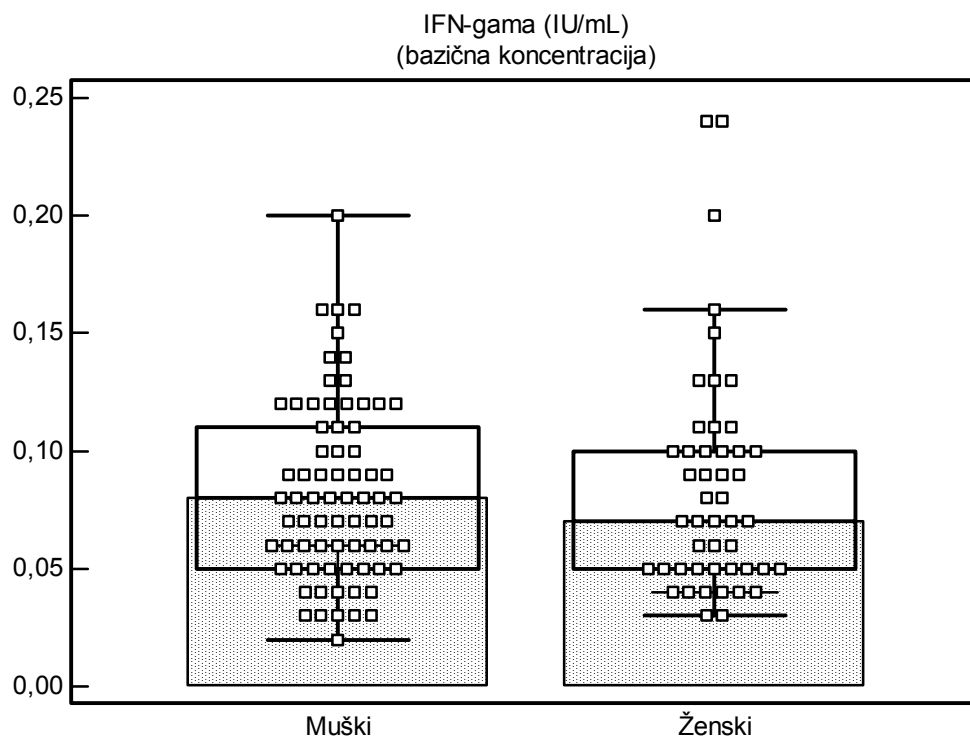


**Slika 16.** Koncentracija IFN- $\gamma$  bez stimulacije (A) i nakon stimulacije (B) mitogenikom (N = 121)

#### 4.7.1. Razlika po spolu

Razlika u bazičnoj koncentraciji IFN- $\gamma$  prema spolu (Slika 17) nije postojala ( $p = 0,824$ ).

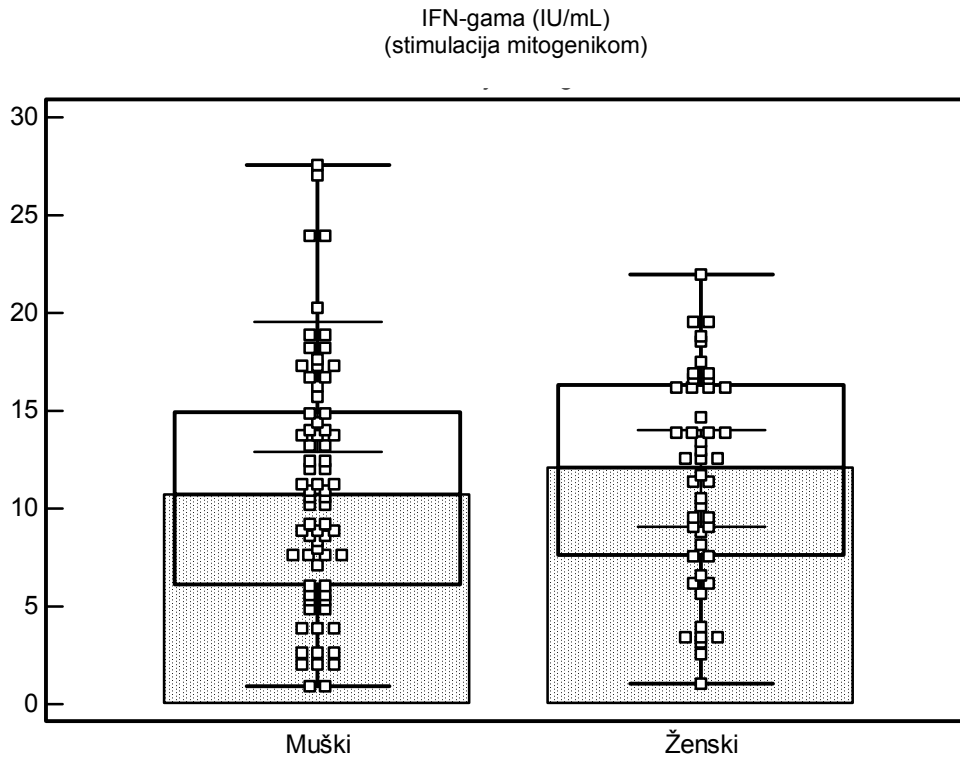
U dječaka je iznosila [M(IQR) = 0,08(0,05-0,11)IU/mL], a u djevojčica [M(IQR) = 0,07(0,04-0,10) IU/mL].



**Slika 17.** Usporedba bazične koncentracije IFN- $\gamma$  u muških (N=72) i ženskih (N=49) ispitanika



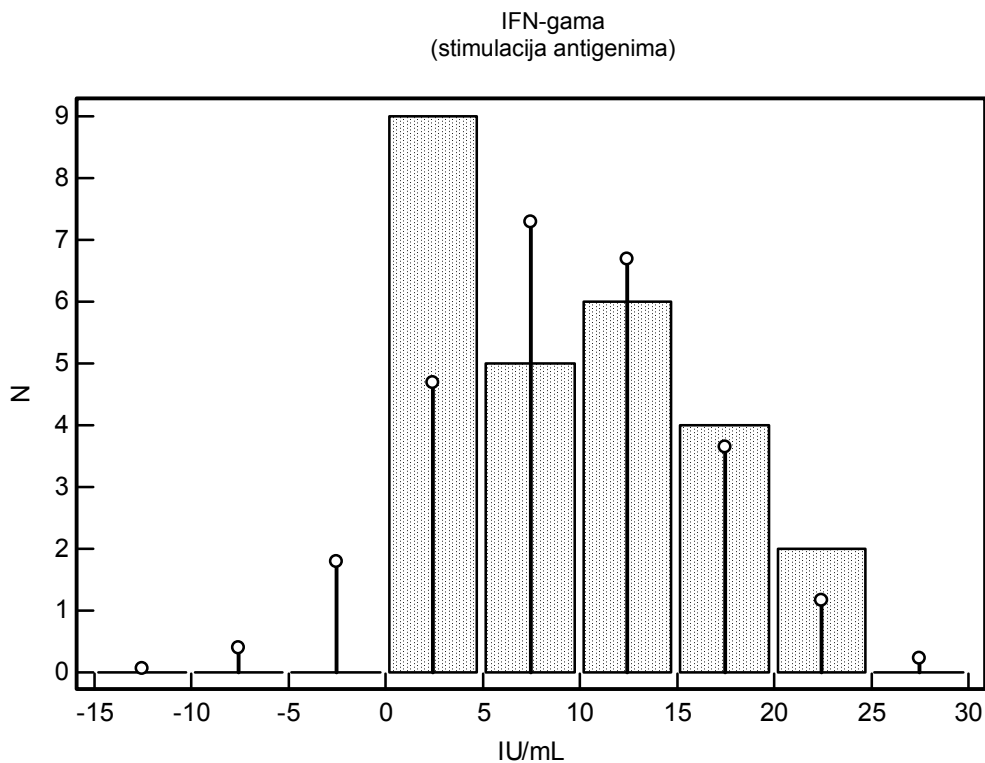
Razlika u koncentraciji IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mitogenikom prema spolu (Slika 18) nije postojala ( $p = 0,681$ ). U dječaka je iznosila  $\bar{x} \pm SD = 11,09 \pm 6,15$  IU/mL, a u djevojčica  $\bar{x} \pm SD = 11,53 \pm 5,31$  IU/mL.



**Slika 18.** Usporedba koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mitogenikom u muških (N=72) i ženskih (N=49) ispitanika

#### 4.7.2. Koncentracija IFN- $\gamma$ nakon stimulacije s mikobakterijskim antigenima

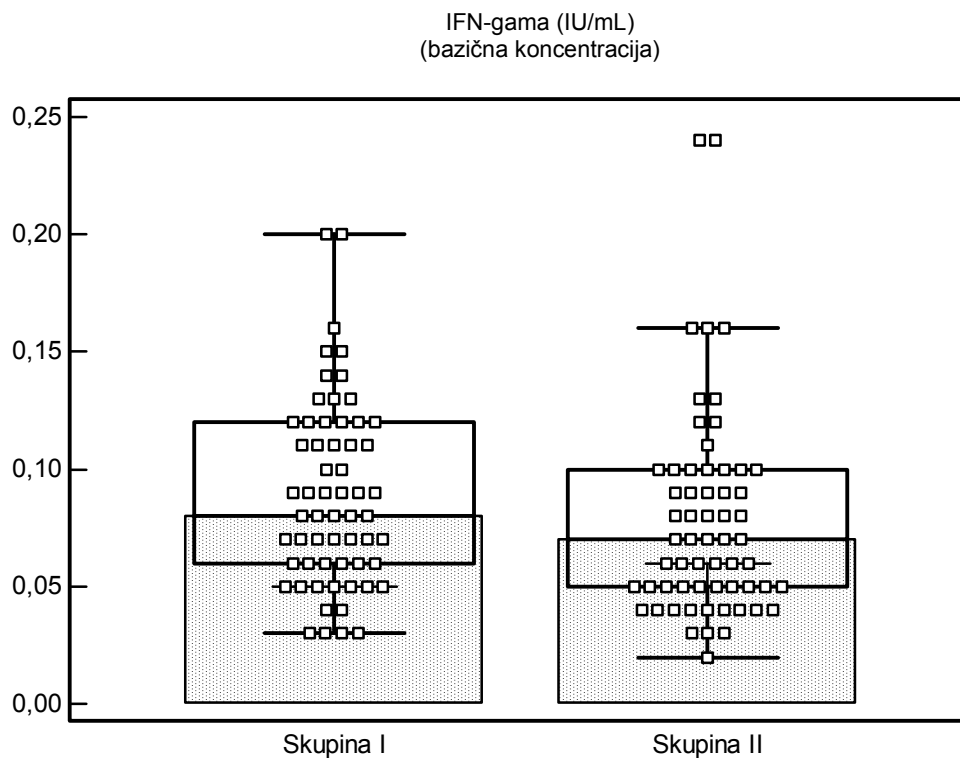
Koncentracija IFN- $\gamma$  u plazmi djece s pozitivnim IGRA-testom (N=26) nakon stimulacije s mikobakterijskim antigenima bila je u rasponu od 0,36–21,71 IU/mL. Srednja vrijednost ( $\bar{x} \pm SD$ ) iznosila je 9,19 $\pm$ 6,76 IU/mL. Najveći broj djece imao je koncentraciju do 5 IU/mL (Slika 19), a 50% djece imalo je koncentraciju IFN- $\gamma$  manju od 8,6 IU/mL.



**Slika 19.** Koncentracija IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima (N =26)

### 4.7. 3. Usporedba koncentracije IFN- $\gamma$ prema dobi

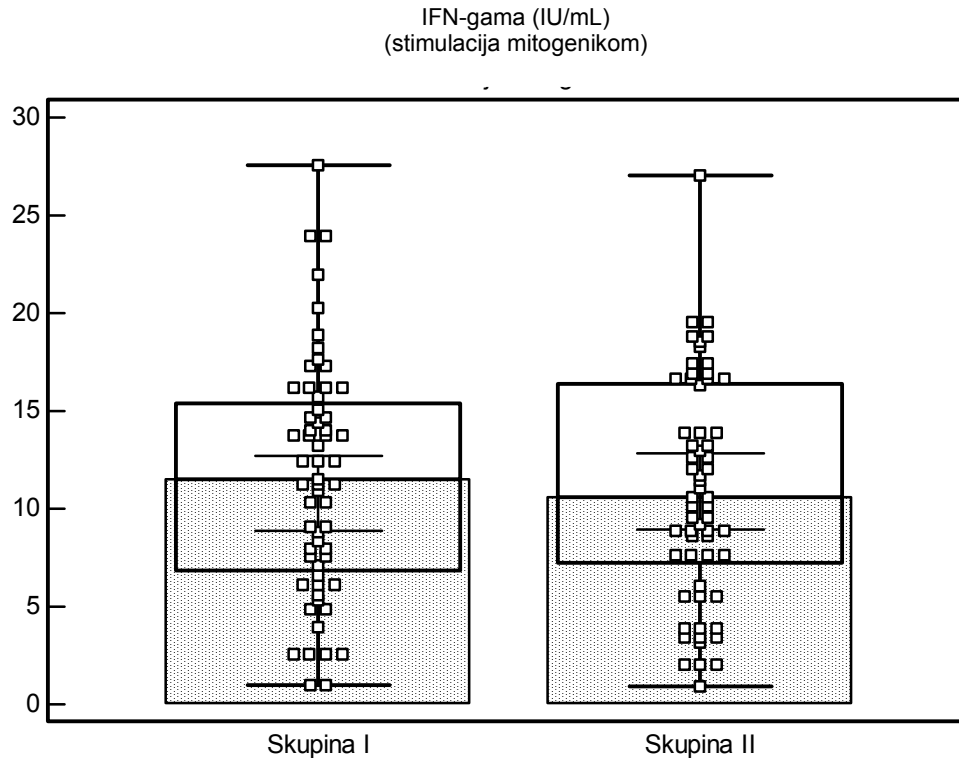
Nije postojala statistički značajna razlika ( $p = 0,058$ ) u bazičnoj koncentraciji IFN- $\gamma$  između mlađe (Skupine I) i starije (Skupine II) djece (Slika 20). Koncentracija IFN- $\gamma$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) u djece u dobi od 1 do 24 mjeseca bila je  $0,09 \pm 0,04$  IU/mL, a u djece u dobi od 25 do 60 mjeseci bila je  $[M(IQR) = 0,07(0,05-0,10)$  IU/mL].



**Slika 20.** Usporedba bazične koncentracije IFN- $\gamma$  u mlađe (Skupina I, N=60) i starije (Skupina II, N=61) djece

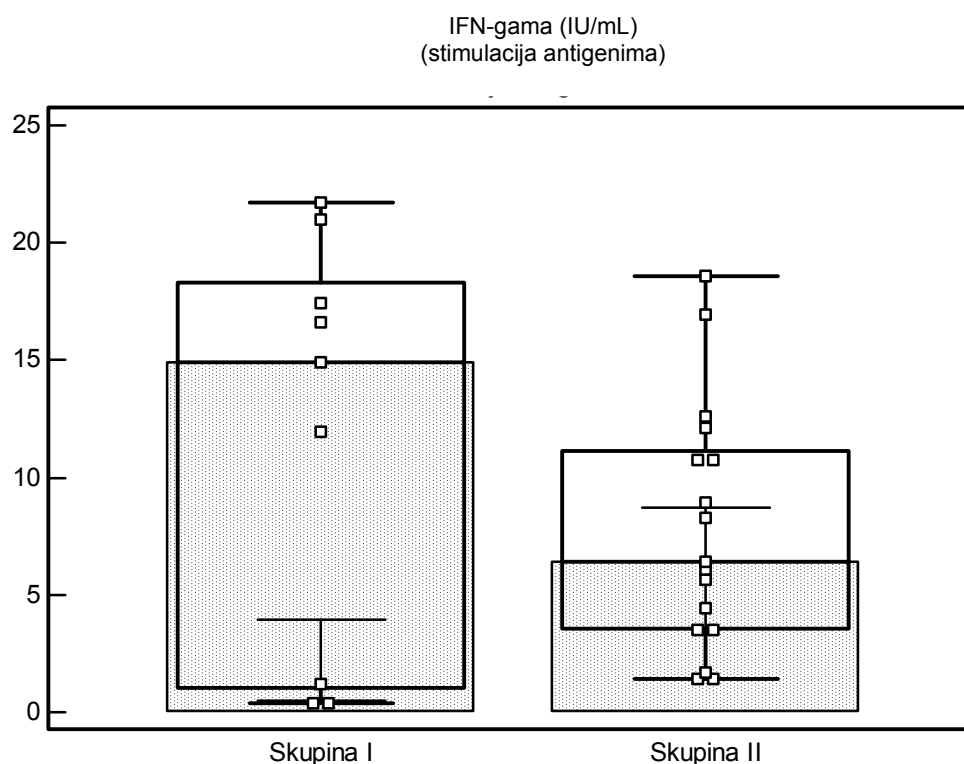
Pokazalo se da nije postojala statistički značajna razlika ( $p = 0,544$ ) ni u koncentraciji IFN- $\gamma$  nakon stimulacije fitohemaglutininom između djece mlađe dobi (Skupina I) i djece starije dobi (Skupina II), Slika 21. Koncentracija IFN- $\gamma$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) u djece u dobi od 1 do

24 mjeseca bila je  $11,59 \pm 6,00$  IU/mL, a u djece u dobi od 25 do 60 mjeseci bila je  $10,94 \pm 5,65$  IU/mL.



**Slika 21.** Usporedba koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mitogenom u mlade (Skupina I, N=60) i starije (Skupina II, N=61) djece

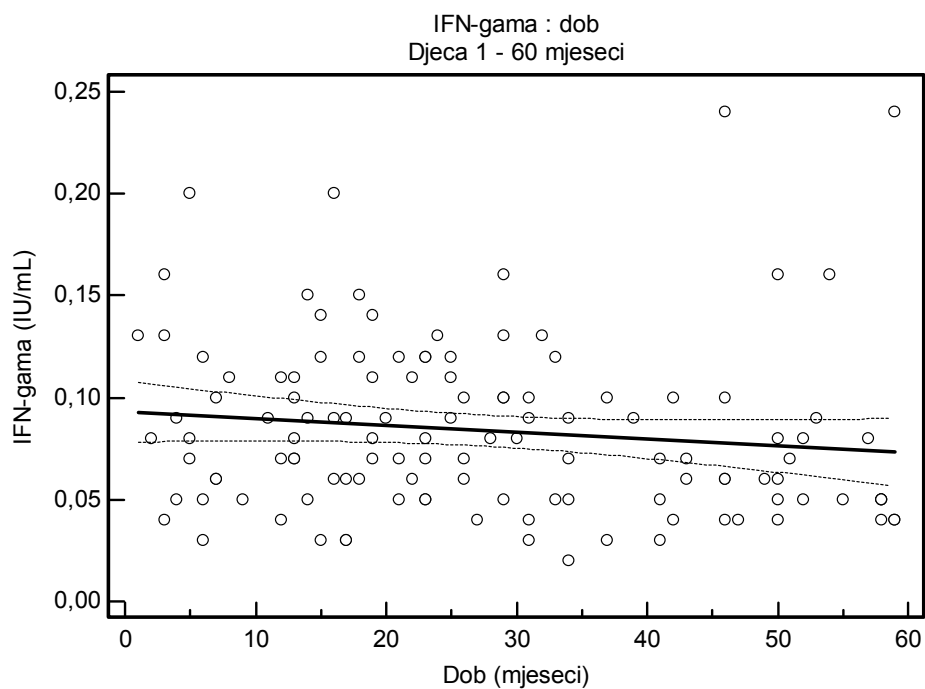
Razlika u koncentraciji IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima između djece mlade dobi (Skupina I, N=9,  $\bar{x} \pm SD = 11,75 \pm 8,77$ ) i djece starije dobi (Skupina II, N=17,  $\bar{x} \pm SD = 7,74 \pm 5,22$  IU/mL) (Slika 22 – prikazane su vrijednosti u djece s pozitivnim nalazom IFN- $\gamma$ , N=26), također nije bila statistički značajna ( $p = 0,073$ ).



**Slika 22.** Usporedba koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima u mlade (Skupina I, N=9) i starije (Skupina II, N=17) djece. Nisu prikazana djeca koja su imala koncentraciju IFN- $\gamma$  < 0,35 IU/mL

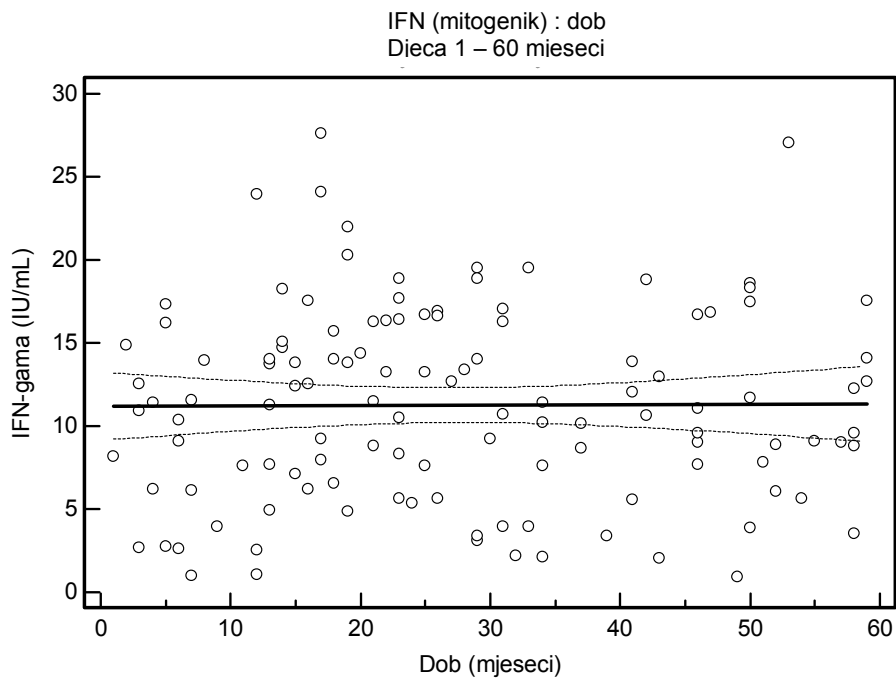
#### 4.7.4. Korelacija između koncentracije IFN- $\gamma$ i dobi djece

Međuovisnosti između bazične koncentracije IFN- $\gamma$ , te koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije leukocita s mitogenikom fitohemaglutininom odnosno mikobakterijskim antigenima i dobi djece također je ispitana. Rezultati izraženi koeficijentom korelacije,  $r$ , uz testiranje statističke značajnosti  $p$ , prikazani su na slikama 23 - 29. Iz prikazanih rezultata na Slici 23 može se uočiti da je neznatna obrnuta korelacija ( $r = -0,205$ , bez praktične važnosti, iako statistički značajna ( $p = 0,025$ )) postojala između bazične koncentracije IFN- $\gamma$  i dobi kod svih ispitanika ( $N = 121$ ).



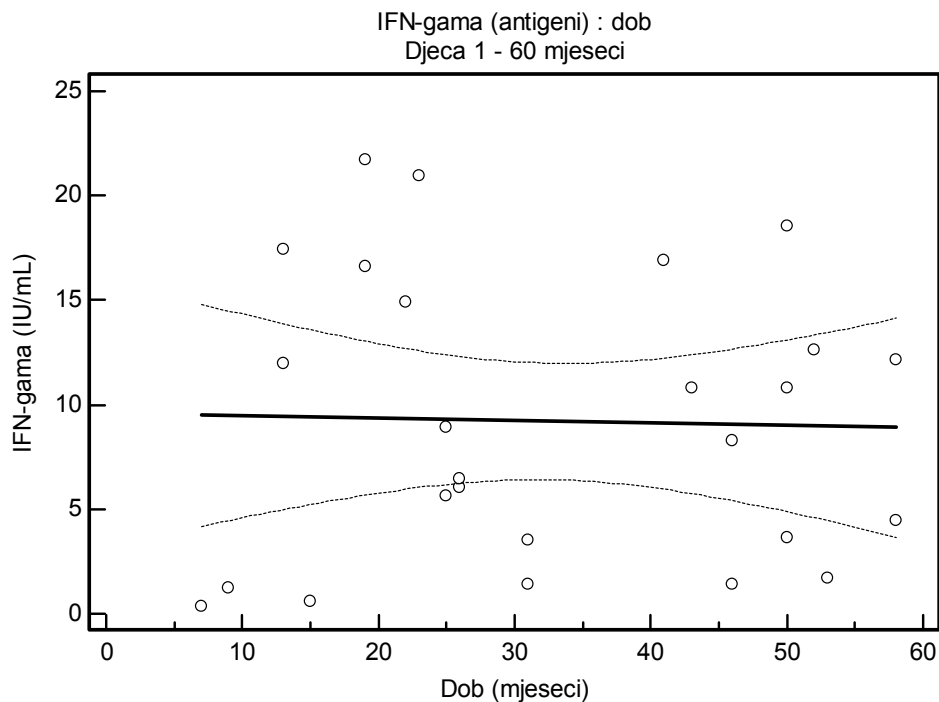
**Slika 23.** Korelacija između bazične koncentracije IFN- $\gamma$  i dobi djece (N = 121),  $r = -0,205$ ,  $p = 0,025$

Korelacija između koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije leukocita s mitogenikom fitohemaglutininom i dobi nije bila značajna u skupini svih ispitanika, N = 121 (Slika 24,  $r = 0,018$ ,  $p = 0,848$ ).



**Slika 24.** Korelacija između koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mitogenikom i dobi djece (N = 121) ( $r = 0,018$ ,  $p = 0,848$ )

Korelacija između koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije leukocita s mikobakterijskim antigenima i dobi u 26 djece koja su imala pozitivan nalaz IFN- $\gamma$  nije bila značajna,  $r = 0,072$ ,  $p = 0,433$  (Slika 25).

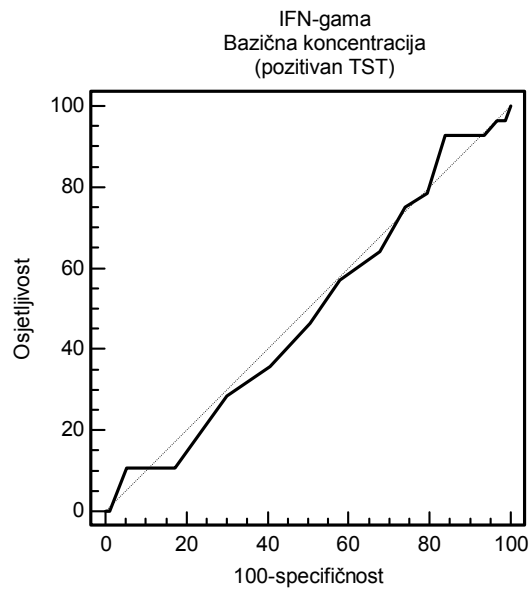


**Slika 25.** Korelacija između koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima i dobi djece (N=26) ( $r = 0,072$ ,  $p = 0,433$ )

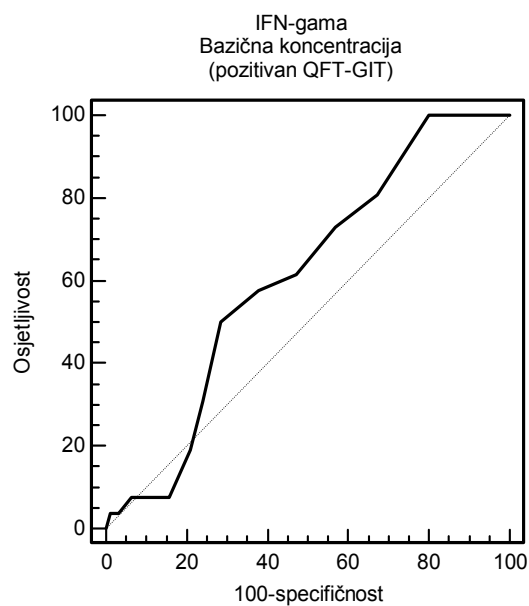
#### 4.7.5. Dijagnostička značajnost određivanja koncentracije IFN- $\gamma$

Dijagnostička značajnost mjerenja koncentracije IFN- $\gamma$  određena je pomoću ROC analize. Analizom ROC krivulje nastojalo se odrediti moguću graničnu vrijednost bazične koncentracije IFN- $\gamma$  s kojom bi se razlikovali ispitanici s LTBI (pozitivni nalazi TST-a i/ili pozitivan nalaz IFN- $\gamma$ ) od djece bez LTBI (Slike 26 i 27, Tablica 20).





**Slika 26.** ROC krivulja bazične koncentracije IFN- $\gamma$  prema pozitivnom nalazu TST-a  
(AUC = 0,487)



**Slika 27.** ROC krivulja bazične koncentracije IFN- $\gamma$  prema pozitivnom nalazu nalazu IFN- $\gamma$  nakon stimulacije antigenima (AUC = 0,609)

Kad su se kao kriterij primijenili pozitivni nalazi TST-a, granična vrijednost  $\leq 0,12$  IU/mL imala je slabu dijagnostičku djelotvornost, AUC = 0,487 (statistička značajnost  $p=0,838$ ) (Tablica 20). Dijagnostička osjetljivost (93%) pokazuje da je 93% djece s pozitivnim TST-om imalo bazičnu koncentraciju IFN- $\gamma$  veću od granične vrijednosti. Dijagnostička specifičnost od 16% pokazuje da je 16% zdrave djece imalo bazičnu koncentraciju IFN- $\gamma$  manju od granične vrijednosti. Pozitivna predvidljiva vrijednost, PPV, pokazuje da bi dijete koje ima koncentraciju IFN- $\gamma >0,12$  IU/mL s vjerojatnošću od 25% moglo imati LTBI. S druge strane, prema NPV može se vidjeti da dijete s koncentracijom IFN- $\gamma <0,12$  IU/mL s 88% vjerojatnosti nema LTBI.

Kad su se kao kriterij primijenili pozitivni nalazi IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima, granična vrijednost  $> 0,09$  IU/mL imala je dovoljno dobru dijagnostičku djelotvornost, AUC = 0,609 (statistička značajnost  $p=0,090$ ). Dijagnostička osjetljivost (50%) pokazuje da je 50% djece s pozitivnim IFN- $\gamma$  imalo bazičnu koncentraciju IFN- $\gamma$  veću od granične vrijednosti. Dijagnostička specifičnost od 72% pokazuje da je 72% zdrave djece imalo bazičnu koncentraciju IFN- $\gamma$  manju od granične vrijednosti. Pozitivna predvidljiva vrijednost, PPV, pokazuje da bi dijete s koncentracijom IFN- $\gamma >0,09$  IU/mL s vjerojatnošću od 33% moglo imati LTBI. S druge strane, prema NPV može se vidjeti da dijete s bazičnom koncentracijom IFN- $\gamma < 0,09$  IU/mL s 84% vjerojatnosti nema LTBI.

**Tablica 20.** Vrijednosti ROC analize za bazičnu koncentraciju IFN- $\gamma$  prema pozitivnom nalazu TST-a i pozitivnom nalazu IFN- $\gamma$

	Bazična koncentracija IFN- $\gamma$	
	prema TST-u	prema IFN- $\gamma$ (stimulacija antigenima)
<b>Granična vrijednost</b>	$\leq 0,12$ IU/mL	$> 0,09$ IU/mL
<b>AUC</b>	0,487	0,609
<b>p</b>	0,838	0,090
<b>SE</b>	0,06	0,07
<b>Osjetljivost</b>	93%	50%
<b>Specifičnost</b>	16%	72%
<b>PPV</b>	25%	33%
<b>NPV</b>	88%	84%

- AUC: površina ispod ROC-krivulje; SE: standardna pogreška;
- Osjetljivost: vjerojatnost da je rezultat pretrage pozitivan ako je bolest prisutna (uistinu pozitivan rezultat);
- Specifičnost: vjerojatnost da je rezultat pretrage negativan ako bolesti nema (uistinu negativan rezultat);
- PPV: vjerojatnost da je bolest prisutna ako je rezultat pretrage pozitivan;
- NPV: vjerojatnost da bolest nije prisutna ako je rezultat pretrage negativan.

ROC analiza učinjena je i za koncentraciju IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mitogenikom fitohemaglutininom (Tablica 21, Slika 28). Kad su se kao kriterij primijenili pozitivni nalazi TST-a, granična vrijednost  $\leq 10,7$  IU/mL imala je slabu dijagnostičku djelotvornost, AUC = 0,536 (statistička značajnost  $p=0,557$ ). Dijagnostička osjetljivost (64%) pokazuje da je 64% djece s pozitivnim TST-om imalo koncentraciju IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mitogenikom veću od granične vrijednosti. Dijagnostička specifičnost od 57% pokazuje

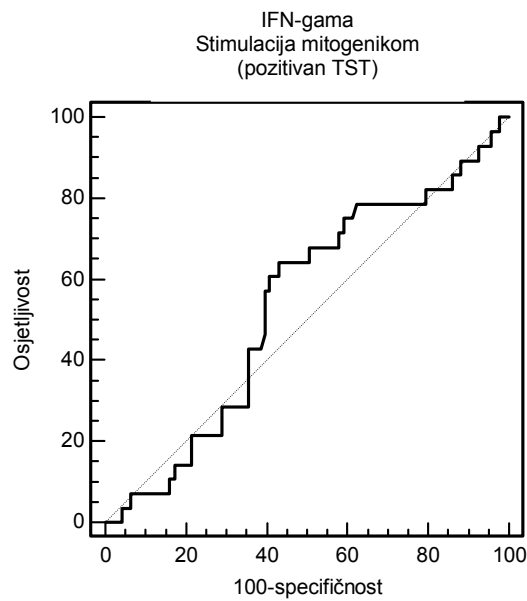
da je 57% zdrave djece imalo koncentraciju IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mitogenom fitohemaglutininom manju od granične vrijednosti. Pozitivna predvidljiva vrijednost, PPV, pokazuje da bi dijete koje ima koncentraciju IFN- $\gamma$  > 10,70 IU/mL s vjerojatnošću od 31% moglo imati LTBI. S druge strane, prema NPV može se vidjeti da dijete s koncentracijom IFN- $\gamma$  < 10,70 IU/mL s 84% vjerojatnosti nema LTBI.

Kad su se kao kriterij primijenili pozitivni nalazi IFN- $\gamma$  nakon stimulacije antigenima (Tablica 21, Slika 29), granična vrijednost > 12,71 IU/mL imala je slabu dijagnostičku djelotvornost, AUC = 0,556 (statistička značajnost p=0,390). Dijagnostička osjetljivost (50%) pokazuje da je 50% djece s pozitivnim IFN- $\gamma$  imalo koncentraciju IFN- $\gamma$  nakon stimulacije antigenima veću od granične vrijednosti. Dijagnostička specifičnost od 63% pokazuje da je 63% zdrave djece imalo koncentraciju IFN- $\gamma$  nakon stimulacije antigenima manju od granične vrijednosti. Pozitivna predvidljiva vrijednost, PPV, pokazuje da bi dijete koje ima koncentraciju IFN- $\gamma$  > 12,71 IU/mL s vjerojatnošću od 27% moglo imati LTBI. S druge strane, prema NPV može se vidjeti da dijete s koncentracijom IFN- $\gamma$  < 12,71 IU/mL s 82% vjerojatnosti nema LTBI.

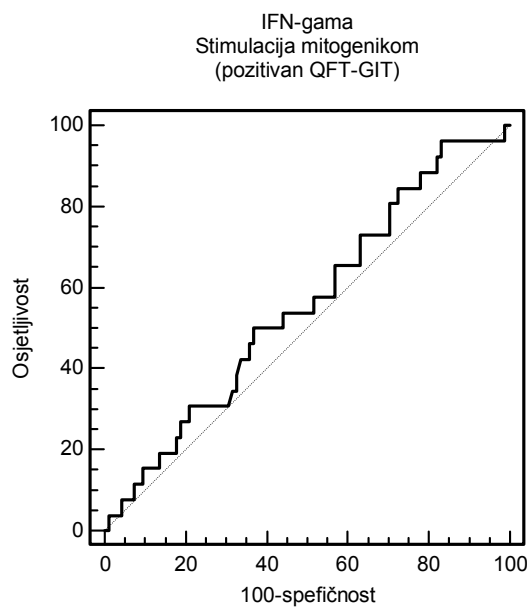
**Tablica 21.** Vrijednosti ROC analize za koncentraciju IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mitogenikom. Prikazani su rezultati prema pozitivnom nalazu TST-a i pozitivnom nalazu IFN- $\gamma$  nakon stimulacije antigenima

	IFN- $\gamma$ (stimulacija mitogenikom)	
	prema TST-u	prema IFN- $\gamma$ (stimulacija antigenima)
<b>Granična vrijednost</b>	$\leq 10,70$	$> 12,71$
<b>AUC</b>	0,536	0,556
<b>p</b>	0,557	0,390
<b>SE</b>	0,06	0,07
<b>Osjetljivost</b>	64%	50%
<b>Specifičnost</b>	57%	63%
<b>PPV</b>	31%	27%
<b>NPV</b>	84%	82%

- AUC: površina ispod ROC-krivulje; SE: standardna pogreška;
- Osjetljivost: vjerojatnost da je rezultat pretrage pozitivan ako je bolest prisutna (uistinu pozitivan rezultat);
- Specifičnost: vjerojatnost da je rezultat pretrage negativan ako bolesti nema (uistinu negativan rezultat);
- PPV: vjerojatnost da je bolest prisutna ako je rezultat pretrage pozitivan;
- NPV: vjerojatnost da bolest nije prisutna ako je rezultat pretrage negativan.



**Slika 28.** ROC krivulja koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mitogenikom. Prikazani su rezultati prema pozitivnom nalazu TST-a (AUC = 0,536)



**Slika 29.** ROC krivulja koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mitogenikom. Prikazani su rezultati prema pozitivnom nalazu IFN- $\gamma$  nakon stimulacije antigenima (AUC = 0,556)

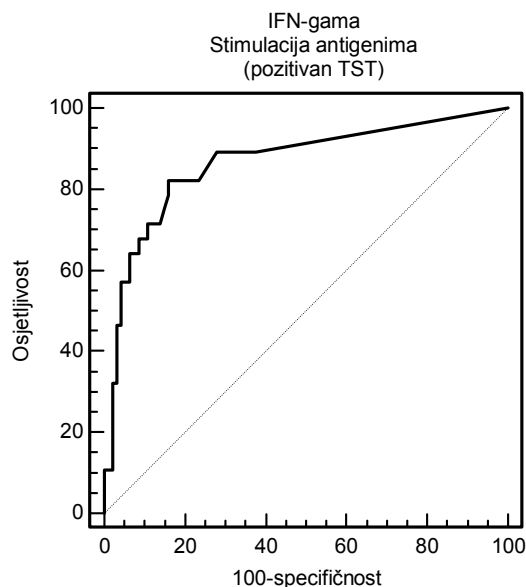
ROC analiza učinjena je i za koncentraciju IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima, prema nalazu TST-a (Tablica 22, Slika 30). Granična vrijednost koja je imala najbolju osjetljivost i specifičnost bila je  $> 0,04$  IU/mL, a razlikovna djelotvornost bila je vrlo dobra, AUC = 0,866 (statistička značajnost  $p=0,0001$ ). Dijagnostička osjetljivost (82%) pokazuje da je 82% djece s pozitivnim TST-om imalo koncentraciju IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima veću od granične vrijednosti od 0,04. Dijagnostička specifičnost od 84% pokazuje da je 84% zdrave djece imalo koncentraciju IFN- $\gamma$  nakon stimulacije antigenima manju od granične vrijednosti. Pozitivna predvidljiva vrijednost, PPV, ukazuje da bi dijete koje ima koncentraciju IFN- $\gamma$   $> 0,04$  IU/mL s vjerojatnošću od 60% moglo imati LTBI. S druge strane, prema NPV može se vidjeti da dijete s koncentracijom IFN- $\gamma$   $< 0,04$  IU/mL s 94% vjerojatnosti nema LTBI. Izračun parametara dijagnostičke djelotvornosti za graničnu vrijednost koncentracije IFN- $\gamma$  od 0,35 IU/mL, smanjuju se dijagnostička osjetljivost (64%) i NPV (90%), a povećavaju specifičnost (91%) i PPV (69%). U tom slučaju dijagnostička specifičnost od 91% pokazuje da je 91% zdrave djece imalo koncentraciju IFN- $\gamma$  nakon stimulacije antigenima manju od granične vrijednosti od 0,35 IU/mL.

**Tablica 22.** Vrijednosti ROC analize za koncentraciju IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima.

	IFN- $\gamma$ (stimulacija antigenima)	
	prema TST-u	prema IFN- $\gamma$ (stimulacija antigenima)
<b>Granična vrijednost</b>	> 0,04	$\geq$ 0,35
<b>AUC</b>	0,866	0,866
<b>p</b>	0,0001	0,0001
<b>SE</b>	0,05	0,05
<b>Osjetljivost</b>	82%	64%
<b>Specifičnost</b>	84%	91%
<b>PPV</b>	60%	69%
<b>NPV</b>	94%	90%

- AUC: površina ispod ROC-krivulje; SE: standardna pogreška;
- Osjetljivost: vjerojatnost da je rezultat pretrage pozitivan ako je bolest prisutna (uistinu pozitivan rezultat);
- Specifičnost: vjerojatnost da je rezultat pretrage negativan ako bolesti nema (uistinu negativan rezultat);
- PPV: vjerojatnost da je bolest prisutna ako je rezultat pretrage pozitivan;
- NPV: vjerojatnost da bolest nije prisutna ako je rezultat pretrage negativan.





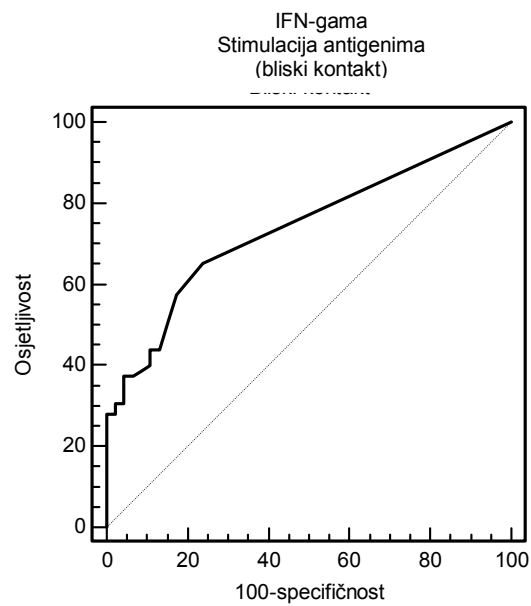
**Slika 30.** ROC krivulja koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima, prema pozitivnom nalazu TST-a (AUC = 0,866)

ROC analiza učinjena je za koncentraciju IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima, prema nalazima indikatora infekcije (Tablica 23, Slike 31 - 34). Pokazalo se da su granične vrijednosti imale dobru (prema bliskom kontaktu AUC=0,738 i pozitivnom nalazu kulture u odraslih osoba AUC=0,756), vrlo dobru (prema nalazu ARB u odrasle osobe AUC=0,885) ili izvrsnu (prema nalazu kaverni na radiogramu odrasle osobe iz kontakta s djetetom AUC=0,968) razlikovnu djelotvornost. Treba napomenuti da su granične vrijednosti koncentracije IFN- $\gamma$  za ispitivane indikatore infektivnosti bile različite. Ako se kao kriterij primijenila prisutnost kaverni granična vrijednost je bila 0,04 IU/mL, a za ostale indikatore bila je manja.

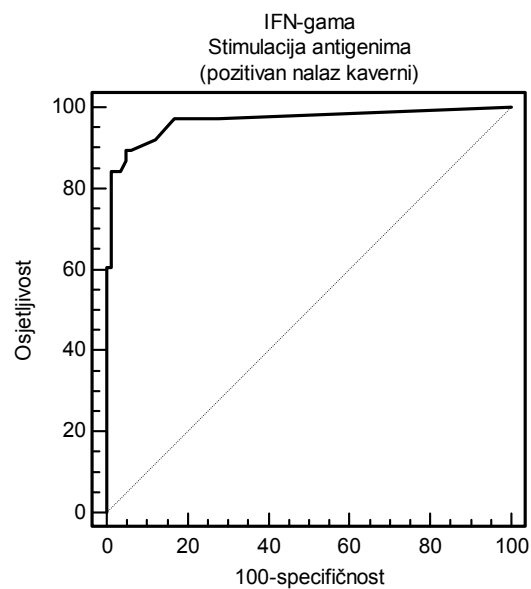
**Tablica 23.** Vrijednosti ROC analize za koncentraciju IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima. Prikazani su rezultati prema kriterijima infektivnosti.

	<b>IFN-<math>\gamma</math> nakon stimulacije antigenima</b>			
	<b>Bliski kontakt</b>	<b>Kaverne</b>	<b>ARB</b>	<b>Kultura</b>
<b>Granična vrijednost</b>	> 0 IU/mL	> 0,04 IU/mL	> 0,02 IU/mL	> 0,01 IU/mL
<b>AUC</b>	0,738	0,968	0,885	0,756
<b>p</b>	<0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0001
<b>SE</b>	0,04	0,02	0,03	0,05
<b>Osjetljivost</b>	65%	90%	81%	53%
<b>Specifičnost</b>	76%	95%	91%	96%
<b>PPV</b>	82%	90%	84%	98%
<b>NPV</b>	57%	95%	88%	36%

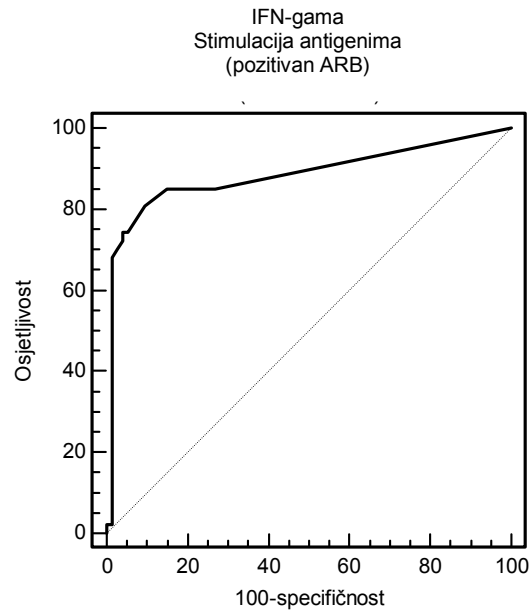
- AUC: površina ispod ROC-krivulje; SE: standardna pogreška;
- Osjetljivost: vjerojatnost da je rezultat pretrage pozitivan ako je bolest prisutna (uistinu pozitivan rezultat);
- Specifičnost: vjerojatnost da je rezultat pretrage negativan ako bolesti nema (uistinu negativan rezultat);
- PPV: vjerojatnost da je bolest prisutna ako je rezultat pretrage pozitivan;
- NPV: vjerojatnost da bolest nije prisutna ako je rezultat pretrage negativan.



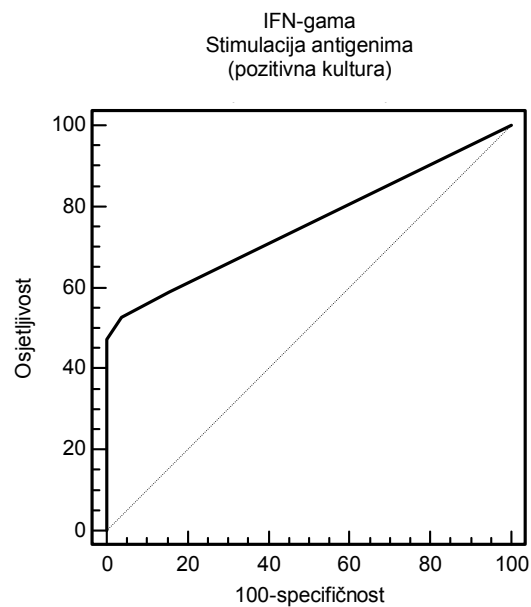
**Slika 31.** ROC krivulja koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima i prema kontaktu s tuberkuloznim bolesnikom (AUC = 0,738)



**Slika 32.** ROC krivulja koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima i prema pozitivnom nalazu kaverni u odrasle osobe iz kontakta (AUC = 0,968)



**Slika 33.** ROC krivulja koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima i prema pozitivnom nalazu acidorezistentnih bacila (ARB) u odrasle osobe iz kontakta (AUC = 0,885)



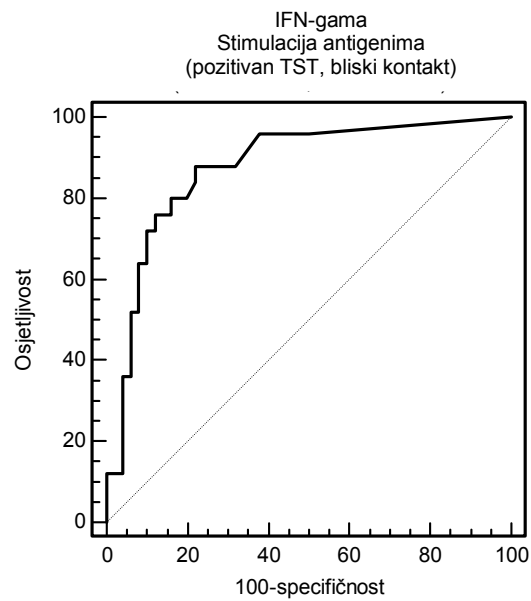
**Slika 34.** ROC krivulja koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima i prema pozitivnom nalazu *M. tuberculosis* u kulturi odrasle osobe iz kontakta (AUC =0,756 )

ROC analiza učinjena je za koncentraciju IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima, prema nalazima indikatora infekcije i prema pozitivnom/negativnom nalazu TST-a (Tablica 24, Slike 35-38). Vrlo dobru dijagnostičku značajnost imala je granična vrijednosti prema bliskom kontaktu (AUC=0,877,  $p<0,0001$ ), dobru dijagnostičku značajnost prema nalazu *M. tuberculosis* u kulturi (AUC=0,756,  $p=0,0001$ ) a dovoljno dobru prema nalazu kaverni (AUC=0,619),  $p=0,0001$ ) i nalazu ARB-a u odraslih osoba (AUC=0,681,  $p=0,020$ ). Granične vrijednosti koncentracije IFN- $\gamma$  za ispitivane indikatore infektivnosti bile su značajno veće ako su se izračunavale prema nalazu kaverni odnosno AFB-a (1,72 IU/mL).

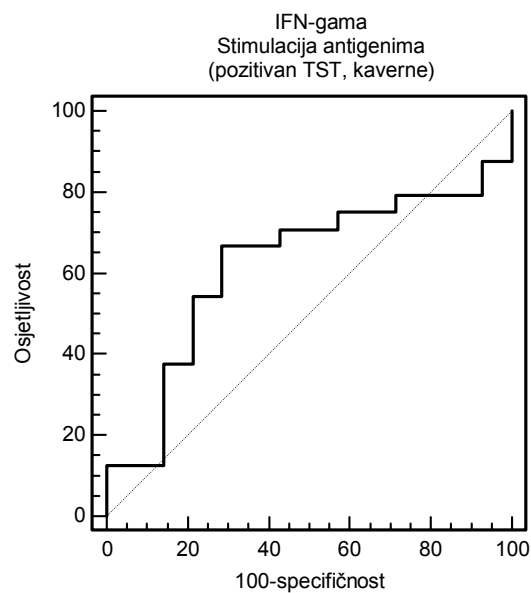
**Tablica 24.** Vrijednosti ROC analize za koncentraciju IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima. Prikazani su rezultati prema kriterijima infektivnosti i prema nalazu TST-a

	IFN- $\gamma$ nakon stimulacije antigenima, prema TST			
	Bliski kontakt	Kaverne	ARB	Kultura
<b>Granična vrijednost</b>	> 0,03 IU/mL	> 1,72 IU/mL	> 1,72 IU/mL	> 0,01 IU/mL
<b>AUC</b>	0,877	0,619	0,681	0,756
<b>p</b>	<0,0001	0,0001	0,020	0,0001
<b>SE</b>	0,05	0,09	0,09	0,05
<b>Osjetljivost</b>	88%	67%	58%	53%
<b>Specifičnost</b>	78%	71%	81%	96%
<b>PPV</b>	67%	80%	79%	98%
<b>NPV</b>	93%	56%	61%	36%

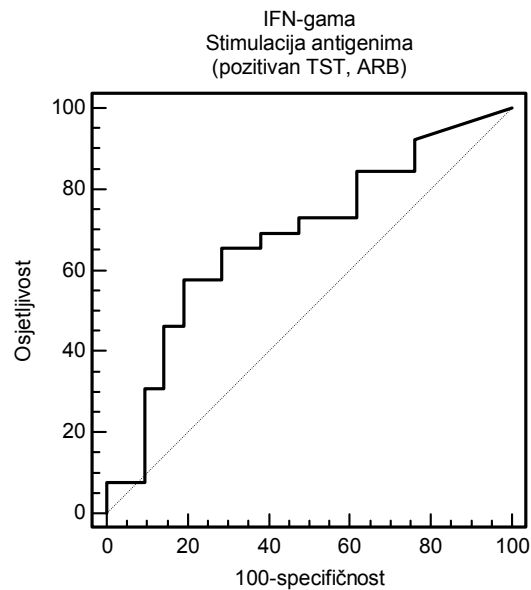
- AUC: površina ispod ROC-krivulje; SE: standardna pogreška;
- Osjetljivost: vjerojatnost da je rezultat pretrage pozitivan ako je bolest prisutna (uistinu pozitivan rezultat);
- Specifičnost: vjerojatnost da je rezultat pretrage negativan ako bolesti nema (uistinu negativan rezultat);
- PPV: vjerojatnost da je bolest prisutna ako je rezultat pretrage pozitivan;
- NPV: vjerojatnost da bolest nije prisutna ako je rezultat pretrage negativan.



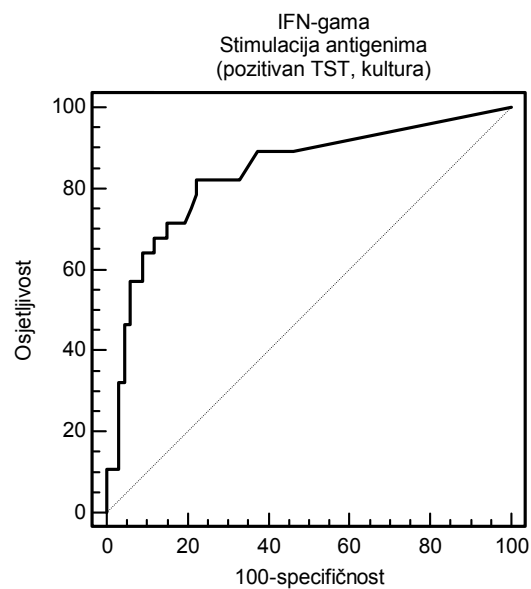
**Slika 35.** ROC krivulja koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima prema nalazu TST-a i prema kontaktu s odraslom tuberkuloznom osobom (AUC = 0,877)



**Slika 36.** ROC krivulja koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima prema nalazu TST-a i prema nalazu kaverni u odrasle osobe iz kontakta (AUC = 0,619)



**Slika 37.** ROC krivulja koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima prema nalazu TST-a i prema nalazu acidorezistentnih bacila (ARB) u uzorku odrasle osobe iz kontakta (AUC = 0,681)



**Slika 38.** ROC krivulja koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima prema nalazu TST-a i prema nalazu *M. tuberculosis* u kulturi kod odrasle (AUC = 0,756)



## 5. RASPRAVA

Analiza rezultata ovog istraživanja potvrdila je hipotezu da određivanje koncentracije IFN- $\gamma$  može doprinijeti preciznijoj dijagnostici LTBI u imunokompetentne djece mlađe od pet godina, poglavito u djece s nesukladnim rezultatima TST-a i IFN- $\gamma$ . To znači da se, temeljem pozitivnog nalaza IFN- $\gamma$  i negativnog (lažno negativnog) nalaza TST-a dijagnoza LTBI-a može potvrditi, a u slučajevima negativnog IFN- $\gamma$  i pozitivnog (lažno pozitivnog) nalaza TST-a, dijagnoza LTBI-a može isključiti. U potonjem slučaju (pozitivan TST/negativan IFN- $\gamma$ ) potrebno je ustvrditi nije li lažno pozitivan nalaz TST-a posljedica infekcije s netuberkuloznim mikobakterijima, ili je nalaz IFN- $\gamma$  lažno negativan, pa je nakon određenog vremena (8-10 tjedana) potrebno ponovno odrediti njegovu koncentraciju (103). Hipoteza da koncentracija IFN- $\gamma$  ovisi o dobi djece mlađe od pet godina nije potvrđena, što ukazuje da u djece koja su bila u kontaktu s *M. tuberculosis*, u uvjetima *ex vivo* limfociti T već od dojenačke dobi mogu na poticaj s mikobakterijskim antigenima odgovoriti povećanom produkcijom IFN- $\gamma$ .

Glavni problem u detekciji LTBI-a je nepostojanje zlatnog standarda za postavljanje dijagnoze LTBI. Zapravo, jedini zlatni standard LTBI-a je mogućnost reaktivacije i razvoja aktivnog TBC-a, što se može ustvrditi praćenjem osoba koje su u riziku od infekcije. Međutim, iz etičkih razloga, osobito u djece, nije moguće ne primijeniti kemoprofilaksu ako se ustanovi da postoji rizik pojave infekcije s mikobakterijem tuberkuloze. Značajnu pozornost treba posvetiti temeljitom prikupljanju anamnestičkih podataka o prediktivnim infektivnim rizicima za pojavu LTBI-a, jer su oni presudni za pojavu tuberkulozne infekcije. Ti faktori uključuju određivanje infektivnosti izvora infekcije i blizine izloženosti osoba koje su u kontaktu s bolesnikom, prisutnost ostalih faktora rizika infekcije, kao što su nalaz kaverni na radiogramu pluća odrasle osobe s

kojom je dijete u bliskom kontaktu, te nalaz ARB-a odnosno nalaz *M. tuberculosis* u biološkim uzorcima odrasle osobe iz kontakta.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da su bliski kontakt i kontakt s bolesnikom koji ima dokazan *M. tuberculosis* u kulturi, signifikantno povezani s rezultatima TST-a i IFN- $\gamma$ .

Ključan rizični faktor za infekciju s *M. tuberculosis* jest dugotrajan bliski kontakt s odraslim bolesnikom koji boluje od aktivne tuberkuloze. Istraživanja u Njemačkoj koja je predvodio Diel, pokazala su dob, nalaz ARB-a i kašalj u osobe iz kontakta, kumulativno vrijeme izloženosti oboljeloj osobi te strano podrijetlo ključni infektivni čimbenici rizika za pojavu LTBI-a (90). Lewinsohn *i sur.* su ustvrdili jači odgovor IFN- $\gamma$  u djece koja su bila u kontaktu s odraslim bolesnikom koji ima kaverne i opsežne promjene na radiogramu pluća, te pozitivne acidorezistentne bacile u iskašljaju (113). Naše prethodno istraživanje u djece mlađe od pet godina pokazalo je da su prediktivni infektivni indikatori za LTBI bili nalaz kaverni u radiološkom nalazu pluća (OR za TST = 7,48,  $p < 0,0001$ ; OR za IFN- $\gamma$  = 6,15,  $p < 0,0001$ ), te pozitivan nalaz ARB-a u biološkom uzorku (OR za TST = 4,47,  $p = 0,0001$ ; OR za IFN- $\gamma$  = 4,01,  $p = 0,0005$ ) odrasle osobe s kojom je dijete u bliskom kontaktu (114). Stručno-znanstvena literatura o tumačenju prediktivnih infektivnih čimbenika još je uvijek oskudna, tako da se rezultati razlikuju od istraživanja do istraživanja. Vjerojatno svaki od nezavisnih infektivnih čimbenika rizika, te epidemiološka situacija utječu na pojavu tuberkulozne infekcije. Leung upozorava da je važna unutarobiteljska izloženost oboljeloj osobi u kući, osobito noću, te nalaz 100 i više ARB-a u vidnom polju razmaza sputuma oboljele osobe iz kontakta (115).

U ovom je istraživanju postojala značajna razlika u prediktivnim čimbenicima rizika ovisno o tome jesu li se u obzir uzeli rezultati pojedinačnih testova TST i IFN- $\gamma$ , ili se rizik izračunavao na temelju sukladnih rezultata TST-a i IFN- $\gamma$ . Temeljem rezultata pojedinačnih testova pokazalo se da su za pojavu LTBI-a ključna dva čimbenika: 1) bliski kontakt s oboljelim odraslom osobom i 2) pozitivan nalaz *M. tuberculosis* u kulturi. Rizik za pojavu LTBI bio je gotovo dvostruko veći (OR za TST = 1,93, p=0,047; OR za IFN- $\gamma$  =1,99, p=0,0002) u djece koja su u bliskom kontaktu s odraslim bolesnikom. Još veći rizik predstavlja dokaz *M. tuberculosis* u iskašljaju odraslog izvora infekcije. Taj je rizik više nego trostruko veći za pojavu LTBI (OR za TST = 3,58, p=0,041; OR za IFN- $\gamma$  =3,65, p=0,0003), ako se u sputumu osobe iz kontakta dokaže mikobakterij tuberkuloze. Svrstavanjem djece u dvije dobne skupine pokazalo se da je pozitivan nalaz *M. tuberculosis* ključan prediktivni infektivni indikator razvoja LTBI-a u djece, kako one mlađe od dvije godine (OR za TST = 2,88, p=0,038 OR za IFN- $\gamma$  =3,00, p=0,045) tako i djece u dobi od dvije do pet godina života (OR za TST = 4,89, p=0,002; OR za IFN- $\gamma$  =4,89, p=0,002). Štoviše, indeks rizika bio je veći u starije djece, što se može protumačiti činjenicom da su starija djeca dulje vremena provela u bliskom kontaktu s oboljelim odraslom osobom. Međutim, kad su se u procjeni rizika u obzir uzeli sukladni rezultati obaju testova (TST i IFN- $\gamma$ ) pokazalo se da su prediktivni faktori rizika bili nalaz kaverni u radiogramu pluća odrasle osobe (OR = 13,38, p<0,0001) i nalaz ARB-a (OR = 6,18, p<0,0001). U djece mlađe od dvije godine rizik pojave LTBI-a zbog nalaz kaverni u radiogramu pluća odrasle osobe bio značajno veći (OR = 19,17, p=0,002) nego u djece u dobi od dvije do pet godina (OR = 9,75, p=0,001). Rizik pojave LTBI-a zbog pozitivnog nalaza ARB-a bio je podjednak u mlađe (OR = 5,48, p=0,020) i u starije djece (OR =

6,50,  $p=0,002$ ). Budući da su naša dosadašnja istraživanja provedena na relativno malom broju uzoraka rezultate bi trebalo potvrditi na većem broju djece s LTBI.

Svaki dijagnostički postupak zahtijeva kvalitetnu interpretaciju i korelaciju rezultata s kliničkim nalazima. Idealan test bi bio onaj za koji postoje pouzdane granične vrijednosti temeljem kojih bi se pacijenti mogli razlikovati od zdravih osoba, ali idealnog testa nema. Dijagnostička vrijednost TST-a ovisi o graničnim vrijednostima koje razdvajaju pozitivne od negativnih rezultata, a granične vrijednosti ovise o tome radi li se o populaciji koja je primila BCG-cjepivo, o križnoj reaktivnosti s netuberkuloznim mikobakterijama i imunosupresivnim stanjima (116-118). Važno je naglasiti da nema jedinstvenog mišljenja o granici između pozitivne i negativne tuberkulinske reakcije, te da je u interpretaciji važna svrha tuberkulinskog testiranja i radi li se o populaciji koja je primila BCG-cjepivo. Tako, kad se ocjenjuje uspjeh BCG-cijepljenja infiltrat od 5 mm ili veći smatra se pozitivnom tuberkulinskom reakcijom, a ukoliko se TST izvodi u svrhu dijagnoze infekcije s *M. tuberculosis* u osoba koje su primile BCG-cjepivo pozitivnom se smatra ona reakcija s promjerom infiltrata 10 mm ili većim (119, 120).

Istraživanja primjene IGRA-testova za dijagnozu LTBI u djece su pokazala da IGRA-testovi imaju prednost pred TST-om zbog više specifičnosti u odnosu na TST, zbog dobre negativne prediktivne vrijednosti, dobre korelacije sa stupnjem izloženosti i vjerojatno su prvi izbor u djece koja su primila BCG cijepivo, te su na taj način korisni u reduciranju preventivne profilaktičke terapije zbog mogućih lažno pozitivnih rezultata TST-a (98, 121-125).

Prema rezultatima ovog istraživanja moglo bi reći da je dijagnoza LTBI potvrđena u 15% djece na temelju pozitivne sukladnosti TST/ IGRA-rezultata, te da je dijagnoza LTBI

isključena u 70% djece na temelju negativne sukladnosti TST/IGRA-rezultata. Preostalih 15% djece imalo je neslaganje rezultata TST-a i IGRA. Pretpostavljajući da IGRA-testovi preciznije dijagnosticiraju LTBI moglo bi se zaključiti da bi 8% (10/121) djece primilo nepotrebnu kemoprofilaksu, te da potrebna kemoprofilaksa ne bi bila dana u 7% (8/121) djece, na temelju rezultata samog TST-a. Treba naglasiti da se pozitivnost IGRA-testa (uz kriterij pozitivnog TST-a), prema preporukama proizvođača, temelji na koncentraciji IFN- $\gamma$  od 0,35 IU/L. Dijagnostička vrijednost te granične koncentracije u djece mlađe od pet godina, određene analizom ROC-krivulje, podrazumijevala je bolju specifičnost (91%) nego osjetljivost (64%), odnosno bolji NPV (90%) nego PPV (69%), što znači da se temeljem granične koncentracije IFN- $\gamma$  može bolje definirati udio zdravih osoba (91%) nego osoba s LTBI (64%). Granična koncentracija IFN- $\gamma$ , koja bi imala najbolju dijagnostičku značajnost (osjetljivost = 82%, specifičnost = 84%, PPV = 60%, NPV = 94%) bila je 0,04 IU/mL, što je deset puta manja vrijednost od vrijednosti koju je propisao proizvođač testa. Prema tome, pomicanjem granične vrijednosti može se mijenjati dijagnostička značajnost metode. Budući da su dijagnostička osjetljivost i specifičnost obrnuto razmjerne, smanjivanjem dijagnostičke osjetljivosti, povećeva se dijagnostička specifičnost. Granična vrijednost koja bi imala bolju specifičnost nego osjetljivost mogla bi pomoći u boljoj diferencijaciji zdravih osoba, a granična vrijednost koja bi imala bolju dijagnostičku osjetljivost nego specifičnost mogla bi bolje svrstati osobe koja imaju LTBI.

Kad je ROC-analiza za koncentraciju IFN- $\gamma$  učinjena nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima, a prema nalazima indikatora infekcije pokazalo se da na određivanje granične vrijednosti IFN- $\gamma$  najviše utječe nalaz kaverni na radiogramu pluća odrasle

osobe iz kontakta ( $\text{IFN-}\gamma > 0,04 \text{ IU/mL}$ ,  $\text{AUC} = 0,968$ ). Kad se osim infektivnih indikatora uzme u obzir i pozitivan nalaz TST-a na definiranje granične vrijednosti  $\text{IFN-}\gamma$  najviše utječe bliski kontakt s tuberkuloznim bolesnikom ( $\text{IFN-}\gamma > 0,03 \text{ IU/mL}$ ,  $\text{AUC} = 0,877$ ).

Budući da je proizvođač testa u računalnom programu predvidio graničnu vrijednost od  $0,35 \text{ IU/mL}$ , o problemu graničnih vrijednosti zasad se može samo teoretizirati. U budućim istraživanjima vjerojatno će se pozornost posvetiti određivanju granične koncentracije  $\text{IFN-}\gamma$  koja bi imala najbolju dijagnostičku vrijednost.

Rezultate TST-a i IGRA-testova jednostavno je interpretirati kada su sukladni. Sukladnost između rezultata TST-a i IGRA testova je varijabilna u raznim studijama. U prethodnom istraživanju sukladnost rezultata TST-a i IGRA-testova bila je dobra (89%;  $\kappa = 0,591$ ), kao i u ovom istraživanju (85%;  $\kappa = 0,588$ ), što je u skladu s rezultatima ranijih istraživanja drugih autora provedenih u djece: Kampmann *i sur.* (86%;  $\kappa = 0,530$ ) (126), Connell *i sur.* (75%;  $\kappa = 0,50$ ) (127), te Bianchi *i sur.* (86%;  $\kappa = 0,533$ ) (128). Nešto bolja sukladnost rezultata u djece mlađe od pet godina opisana je u istraživanju Okada *i sur.* (88%;  $\kappa = 0,626$ ), a posebno u djece mlađe od dvije godine (95%;  $\kappa = 0,828$ ) (121). U našem istraživanju nije bilo razlike u sukladnosti rezultata između djece dobi od 1-24 mjeseca (85%;  $\kappa = 0,521$ ) i od 25-60 mjeseci (85%;  $\kappa = 0,592$ ). Nesukladnost između rezultata TST-a i IGRA-testova ukazuje na činjenicu da u neke djece jedan od ta dva testa daje lažno pozitivne ili lažno negativne rezultate. Lažno pozitivni TST može ukazivati na nedostatak njegove specifičnosti za dijagnozu LTBI. Poznato je da prethodna primjena BCG cijepiva ili infekcija s netuberkuloznim mikobakterijama može dovesti do lažno pozitivnog TST-a (89, 129). Naime, kako PPD sadrži više od 200 antigenskih proteinskih

komponenti koje su zajedničke većini mikobakterija, važno ograničenje TST-a je njegova nemogućnost razlikovanja infekcije uzrokovane *M. tuberculosis* i nekom od netuberkuloznih mikobakterija (5, 130). U našem istraživanju BCG cjepivo bi moglo biti glavni uzrok TST-pozitivne/IGRA-negativne nesukladnosti. Poznato je da BCG cjepivo nema utjecaja na IGRA-testove (131). Lažno negativni TST može ukazati na oštećenu funkciju T-limfocita (132), zatim slabu reaktivnost kože u male djece (68) ili ako se pogrešno očita kao negativan. Neki autori su ukazali na mogućnost da IGRA-pozitivna/TST-negativna nesukladnost može značiti nedavnu izloženost *M. tuberculosis* (133, 134).

Razmimoilaženje TST-a i IGRA-rezultata može biti posljedica različitih imunoloških mehanizama na kojima se zasnivaju principi određivanja dvaju testova. IGRA-testovi zbog kratkog perioda inkubacije stanica sa specifičnim antigenima ili PHA određuju aktivnost efektorskih limfocita T i mjere samo oslobađanje jednog citokina za razliku od TST-a kojim se određuje aktivnost efektorskih i memorijskih limfocita T, te mjeri reakcija koja je, ne samo posljedica djelovanja IFN- $\gamma$ , nego i posljedica djelovanja interleukina (IL)-10, IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$  i granulocitno stimulirajućeg čimbenika (od engl. granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), ostavljajući mogućnost da TST pozitivni rezultat uhvati imunološki odgovor u vrlo male djece stvarno inficirane s *M. tuberculosis*, koja bi se propustila samim IGRA-testom (135).

Rezultati o povezanosti dobi i koncentracije IFN- $\gamma$  u *ex vivo* uvjetima su kontradiktorni. Ima autora koji smatraju da limfociti T u male djece nisu na poticaj antigenima sposobni odgovoriti oslobađanjem IFN- $\gamma$  kao starija djeca (136). U ovom istraživanju nije dokazana korelacija koja bi imala praktičnu važnost između koncentracije IFN- $\gamma$  nakon

stimulacije leukocita s mitogenikom PHA, te nakon stimulacije leukocita s mikobakterijskim antigenima i dobi ispitanika, što upućuje na činjenicu da dob djeteta nije imala utjecaja na koncentraciju IFN- $\gamma$ , te da se IGRA-test može primijeniti i u djece najmlađe životne dobi. Ti su rezultati sukladni rezultatima Lewinsohn *i sur.* koji su pokazali da djeca mlađa od pet godina imaju snažan IFN- $\gamma$  odgovor usporediv s onim u odraslih, što upućuje na zaključak da osjetljivost IGR-testova ne bi trebala biti smanjena u djece manje životne dobi (113). Neki su autori ustanovili niže vrijednosti IFN- $\gamma$  nakon stimulacije mitogenom PHA, otvorivši pitanje granične vrijednosti za IGRA-test (127, 135). Naime, granična vrijednost od 0,35 IU/mL koja se primjenjuje i u djece zapravo je utvrđena za odrasle u Japanu (111). Pretpostavljajući da djeca niže životne dobi proizvode prosječno manje IFN- $\gamma$  nego starija djeca, predložena je korekcija granične vrijednosti za mlađu djecu (127, 137), kako bi se povećala osjetljivost IGRA-testova za dijagnozu LTBI. Dobiveni rezultati nisu u skladu s tim zaključkom, jer nije ustanovljen smanjen odgovor limfocita T na stimulaciju mikobakterijskim antigenima u djece mlade životne dobi, što djelomično možemo objasniti i zdravom populacijom djece koju smo ispitivali. Štoviše u ovom istraživanju koncentracija IFN- $\gamma$  nakon stimulacije limfocita s PHA, nije ovisila o dobi djece, što ukazuje da su limfociti T u djeca najmanje životne dobi sposobni odgovoriti i na poticaj antigenom.

IGRA-testom se određuje količina IFN- $\gamma$  oslobođena iz limfocita T prethodno izloženim antigenima specifičnim za *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10 i TB7.7) koji razlikuju *M. tuberculosis* od većine drugih mikobakterija (111). No, ovdje je potrebno naglasiti da sljedeće atipične mikobakterije *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*, *M. flascences* i *M. gastrii* dijele neke zajedničke antigene s *M. tuberculosis*, te na taj način mogu dovesti do



pozitivnih (lažno pozitivnih) rezultata IGRA-testa (138). Lažno negativni rezultati IGRA-testova mogu ukazati na imunokompromitiranog ispitanika ili pogreške u prikupljanju uzorka krvi (139). U tim je slučajevima potrebno serijsko određivanje koncentracije IFN- $\gamma$ , kako bi se utvrdilo da se radilo o lažno negativnom rezultatu u slučaju konverzije negativnog u pozitivni rezultat (139). U takvim slučajevima preporuča se ponoviti test 8-10 tjedana nakon završetka kontakta s bolesnikom koji boluje od aktivne TBC (140). Serijskim određivanjem koncentracije IFN- $\gamma$  u djece izložene aktivnoj TBC, moguće je pratiti dinamiku kretanja koncentracije IFN- $\gamma$ . Nedostatni su podatci o dinamici koncentracije IFN- $\gamma$  za vrijeme LTBI ili aktivne TBC, posebno u djece. Rezultati studije Nenadić *i sur.* su pokazali da većina djece s LTBI i aktivnom TBC nakon provedene terapije i nadalje imaju pozitivan rezultat IGRA-testa, ukazujući da IGRA-testovi nisu pogodni za praćenje uspjeha terapije (141). Prema Pai, serijskim određivanjem IFN- $\gamma$  otkrivaju se četiri moguća fenotipa: perzistentno pozitivni (osobe koje su stalno pozitivne kroz duži vremenski period), stabilni konverteri (osobe koje postaju pozitivne, te zadržavaju pozitivnost kroz određeno vrijeme), nestabilni konverteri (osobe koje postaju pozitivne, a nakon nekog vremena se negativiziraju), te perzistentno negativni (osobe koje su stalno negativne kroz duži vremenski period) (142). Buduće studije bi trebale razjasniti prognostičku vrijednost svakog od ovih fenotipova. Pod konverzijom podrazumijevamo promjenu koncentracije IFN- $\gamma$  iz negativne u pozitivnu, a reverzija podrazumijeva promjenu iz pozitivne u negativnu. Budući da nema konsenzusa o intervalu nesigurnosti, tzv. sivoj zoni graničnih vrijednosti koncentracije IFN- $\gamma$ , reverziju i konverziju je teško interpretirati. Tako su Pai *i sur.* predložili primjenu nesigurnog intervala koncentracije IFN- $\gamma$  za interpretaciju serijskog testiranja u rasponu od 0,20 –

0,50 IU/mL (143). To znači da su vrijednosti koncentracije IFN- $\gamma$  <0,20 IU/mL i >0,50 IU/mL stvarno negativne i stvarno pozitivne, a promjene koncentracije IFN- $\gamma$  unutar navedenog intervala se smatraju „nesigurnom konverzijom“ i „nesigurnom reverzijom“. Ringshausen *i sur.* su u svome istraživanju primjenili raspon koncentracije IFN- $\gamma$  od 0,20 – 0,70 IU/mL kao granični raspon, a porast koncentracije IFN- $\gamma$  od negativne < 0,35 IU/mL na vrijednost  $\geq$ 0,70 IU/mL definirali kao pravu konverziju (144). Prema Veerapathran *i sur.* o konverziji IFN- $\gamma$  govorimo kada su zadovoljena dva kriterija: promjena vrijednosti iz negativne u pozitivnu, te porast koncentracije IFN- $\gamma$  za najmanje 30% od početne koncentracije (145). Iz navednog se može zaključiti da je za preciznu interpretaciju serijskog testiranja koncentracije IFN- $\gamma$  u djece nužno točno definirati konverziju, reverziju i interval nesigurnosti.

Velika prednost IGRA-testova, u odnosu na TST, je i mogućnosti određivanja pozitivne i negativne kontrole. Pozitivna kontrola s mitogenikom PHA služi za provjeru imunog statusa ispitanika i provjeru ispravnosti postupanja s uzorkom kako bi se izbjegli mogući lažno negativni rezultati, dok negativna kontrola daje uvid u količinu IFN- $\gamma$  koji je prisutan u cirkulaciji neovisno o podražajima *ex vivo*.

U nekim se istraživanjima ukazalo na problem neodredivih rezultata, rezultata IGRA-testa, kada nije moguće odrediti koncentraciju IFN- $\gamma$ . U našem istraživanju određivanje koncentracije IFN- $\gamma$  nije rezultirao niti jednim neodredivim rezultatom što je najvjerojatnije posljedica standardizacije predanalitičkih i analitičkih postupaka, te zdrave populacije djece naših ispitanika. Prema podacima Bianchi *i sur.* (128), Lighter *i sur.*, (135) te Zrinski Topić *i sur.* (146) rutinska upotreba IGRA-testa u imunokompetentne djece daje vrlo malo neodredivih rezultata (0,6%; 1,4%; 0,46%).

Međutim, radovi Kampmann *i sur.*(126), Detjen *i sur.* (95) i Bergamini *i sur.* (147) izvješćuju o znatno većem broju (6,7%; 6,8%; 16,4%) neodredivih rezultata. Kao moguće razloge za pojavu neodredivih rezultata najčešće navode dob djece ili tehničke pogreške kod uzimanja uzoraka i postupanja s uzorcima. U radu Connell *i sur.* (148) opisana je znatno veća pojavnost neodredivih rezultata u djece mlađe od tri godine (12,5%) naspram samo 1,1% u starije djece, dok je u istraživanju Bergamini *i sur.*(147) razlika još izraženija; 21,5% neodredivih rezultata u djece mlađe od četiri godine u odnosu na 0,4% u djece starije od četiri godine. U oba navedena rada broj djece u mlađim podskupinama bio je mali; 16 odnosno 65 u odnosu na radove gdje se opisuje mali udio neodredivih rezultata: 152 ispitanika mlađa od 4 godine (128), odnosno 313 djece mlađe od 5 godina (146), što je jedan od mogućih razloga visokom udjelu neodredivih rezultata. Prema nekim autorima postoji povezanost između proizvodnje IFN- $\gamma$  i dobi (135, 149), pa je prema Haustein *i sur.* mlađa dob povezana s većom vjerojatnošću neodredivih rezultata određivanja koncentracije IFN- $\gamma$  u imunokompetentne djece. Autori čak predlažu da se granična vrijednost za pozitivnu kontrolu prilagodi dječjim sposobnostima sinteze IFN- $\gamma$ . Pouzdanost IGRA metoda podložna je predanalitičkim i analitičkim čimbenicima. Kako bi se izbjegle moguće tehničke pogreške i smanjio broj eventualnih zahtijeva za novim uzorcima potrebno je standardizirati predanalitičku i analitičku fazu tako da uzorkovanje provode dobro izvježbani vadioci, period od uzorkovanja do inkubacije bude podjednak za sve uzorke, podjednako vrijeme trajanja inkubacije, te da se analitički dio provodi striktno prema uputama proizvođača. Na taj način sigurni smo da neodredivi rezultati nisu uzrokovani predanalitičkim i/ili analitičkim čimbenicima. Prema do sada objavljenim podacima, prvenstveno u odraslih ispitanika, poznata su brojna klinička

stanja koja mogu doprinijeti pojavi neodredivih rezultata. Terapija imunosupresivnim lijekovima, transplantacija organa, maligne bolesti i primarne imunodeficiencije su najčešća imunokompromitirana stanja koja se povezuju s pojavom neodredivih rezultata u djece (149). Češća pojava neodredivih rezultata opisana je u akutnoj tuberkulozi (126, 149) ili pneumoniji (95). Također je poznato da  $\beta$ -laktamski benzilpenicilin konjugira s IFN- $\gamma$ , selektivno smanjujući aktivnost IFN- $\gamma$ , te na taj način ometa određivanje koncentracije IFN- $\gamma$  (150), pa se svakako preporuča odgoditi određivanje koncentracije IFN- $\gamma$  u djece koja su pod terapijom  $\beta$ -laktamskim antibiotikom. Prema radu Downing *i sur.* blaga hipertermija može potaknuti sintezu IFN- $\gamma$  dok Huang *i sur.* smatraju da vrućica može djelovati kao fiziološki adjuvans na T<sub>H</sub>1 stanice (151, 152). Limfopenija, posebice smanjen broj CD4<sup>+</sup> stanica, često je opisani laboratorijski nalaz koji se dovodi u vezu s pojavom neodredivih rezultata (153, 154), dok su hipoproteinemija i hipoalbuminemija opisane samo u ispitanika starijih od 80 godina (155). Kao jedan od dodatnih, mogućih rizičnih čimbenika nameće se i atopija. Supresivni učinak IFN- $\gamma$  na alergen-specifični imunološki odgovor posredovan je mnogobrojnim mehanizmima (156). U atopičara je smanjen broj stanica koje stvaraju IFN- $\gamma$  u usporedbi sa zdravim ispitanicima, a nedostatan T<sub>H</sub>1 imunološki odgovor narušava neophodnu ravnotežu između T<sub>H</sub>1 i T<sub>H</sub>2 imunoreakcije i pogoduje razvoju alergijskih bolesti. Kako bi se izbjegla pojava neodredivih rezultata i opetovano uzorkovanje te smanjili materijalni troškovi IGRA je bolje izvoditi nakon akutne upale.

Rizik razvoja aktivne TBC nakon akutne infekcije u male djece je velik, pa je rano otkrivanje djece inficirane s *M. tuberculosis* glavni čimbenik u prevenciji akutne TBC. Djeca sa TST-pozitivnom/ IGRA-pozitivnom sukladnošću vrlo vjerojatno imaju LTBI i

trebaju dobiti odgovarajuću kemoprofilaksu. Djeca s TST-negativnom/IGRA-pozitivnom nesukladnošću su vrlo vjerojatno stvarno inficirana s *M. tuberculosis* zbog visoke specifičnosti IGRA, te također trebaju biti adekvatno tretirana.

U djece s TST-pozitivnom/IGRA-negativnom nesukladnošću rezultata postoji velika vjerojatnost da je TST pozitivan zbog niske specifičnosti TST-a u djece koja su primila BCG-cjepivo, pa bi serijsko određivanje IFN- $\gamma$  moglo biti korisno u dobivanju pouzdane dijagnoze i donošenju odluke da li je pozitivan TST posljedica infekcije s *M. tuberculosis* ili lažno pozitivne reakcije. Prema rezultatima istraživanja kojeg su proveli Higuchi *i sur.* u djece školske dobi koja su bila u kontaktu s aktivnom TBC, svima s TST-pozitivnom/IGRA-negativnom nesukladnošću ne bi se trebala preporučiti profilaktička terapija (157). Naime, u prospektivnom praćenju tijekom 3,5 godine niti jedno dijete s TST-pozitivnom/IGRA-negativnom nesukladnošću rezultata nije razvilo aktivnu TBC iako nitko nije uzimao profilaktičku terapiju. Međutim, takav pristup zahtijeva daljnja istraživanja i provjere valjanosti. Istraživanje Diel *i sur.* provedeno na 106 djece koja su bila u bliskom kontaktu s aktivnom TBC pokazalo je da IGRA-test ima 100% negativnu prediktivnu vrijednost, jer niti jedno dijete s negativnim IGRA-testom tijekom praćenja od 3,7 godina, a bez ordinirane profilaktičke terapije nije razvilo aktivnu bolest (158). No, 6 od 21 (28,6%) djeteta s pozitivnim rezultatom IGRA-testa, koja nisu tretirana razvila su aktivnu bolest, što je statistički značajno više nego u odraslih ispitanika iz istog istraživanja (10,3%) potvrđujući od ranije poznatu činjenicu da je rizik od razvoja aktivne bolesti nakon akutne infekcije u djece znatno veći nego u odraslih.

Budući da su rezultati ovog istraživanja pokazali da koncentracija IFN- $\gamma$  ne ovisi o dobi djeteta, IGRA-test može se, u svrhu otkrivanja LTBI-a primijeniti i u djece dojenačke

dobi, što znači da vrlo rana životna dob ne ograničava njegovu provedbu. No, bez dobro definiranih graničnih vrijednosti i bez postojanja zlatnog standarda za dijagnostiku LTBI ne može se ustvrditi koja metoda, IGRA ili TST, ima bolju dijagnostičku vrijednost. U složenom postupku dijagnosticiranja LTBI-a, kada postoje nesukladni rezultati TST-a i IGRA-testa, određivanje koncentracije IFN- $\gamma$  može biti ključno u odluci hoće li se kod određenog djeteta primijeniti preventivna terapija (iako je TST negativan) ili će se upravo temeljem negativnog testa (iako je TST pozitivan) izbjeći nepotrebna kemoprofilaksa. U tom smislu određivanje koncentracije IFN- $\gamma$  doprinosi boljoj i preciznijoj zahtjevnoj dijagnostici LTBI u djece mlađe od pet godina.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Bliski kontakt s odraslim tuberkuloznim bolesnikom, koji je utvrđen u 62% ispitivane djece gotovo dvostruko povećava rizik pojave LTBI (OR za TST = 1,93, p=0,047; OR za IFN- $\gamma$  =1,99, p=0,0002, Tablice 7 i 8).
2. U djece mlađe od dvije godine rizik za pojavu LTBI-a trostruko je veći ako odrasla oboljela osoba ima pozitivan nalaz *M. tuberculosis* u biološkom uzorku (OR za TST = 2,88, p=0,038 OR za IFN- $\gamma$  =3,00, p=0,045, Tablice 10 i 11).
3. U djece u dobi od dvije do pet godina rizik za pojavu LTBI je gotovo peterostruko veći ako odrasla oboljela osoba ima pozitivan nalaz *M. tuberculosis* u biološkom uzorku (OR za TST i za IFN- $\gamma$  =4,89, p=0,002, Tablice 13 i 14).
4. U slučaju sukladnih testova TST i IFN- $\gamma$  pokazalo se da su prediktivni faktori rizika bili nalaz kaverni u radiogramu pluća odrasle osobe (OR = 13,38, p<0,0001) i nalaz ARB-a (OR = 6,18, p<0,0001), Tablica 9.
5. U djece mlađe od dvije godine rizik pojave LTBI-a kod nalaza kaverni na radiogramu pluća odrasle osobe bio je značajno veći (OR = 19,17, p=0,002) nego u djece u dobi od dvije do pet godina (OR = 9,75, p=0,001). Rizik pojave LTBI-a zbog pozitivnog nalaza ARB-a bio je podjednak u mlađe (OR = 5,48, p=0,020) i u starije djece (OR = 6,50, p=0,002), Tablice 12 i 15.
6. Nije postojala statistički značajna razlika (p = 0,058) u bazičnoj koncentraciji IFN- $\gamma$  između mlađe i starije djece, Slika 20. Koncentracija IFN- $\gamma$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) u

djece u dobi do dvije godine bila je  $0,09 \pm 0,04$  IU/mL, a u djece u dobi većoj od dvije godine bila je [M(IQR) =  $0,07(0,05-0,10)$  IU/mL].

7. Nije postojala statistički značajna razlika ( $p = 0,544$ ) u koncentraciji IFN- $\gamma$  nakon stimulacije fitohemaglutininom između djece mlađe dobi i djece starije dobi, Slika 21. Koncentracija IFN- $\gamma$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) djece u dobi do dvije godine bila je  $11,59 \pm 6,00$  IU/mL, a u djece u dobi većoj od dvije godine bila je  $10,94 \pm 5,65$  IU/mL.
8. Razlika u koncentraciji IFN- $\gamma$  ( $\bar{x} \pm SD$ ) nakon stimulacije mikobakterijskim antigenima između djece mlađe od dvije godine ( $11,75 \pm 8,77$  IU/mL) i djece starije od dvije godine ( $7,74 \pm 5,22$  IU/mL) nije bila statistički značajna ( $p = 0,073$ ), Slika 22.
9. Koncentracija IFN- $\gamma$  nakon stimulacije limfocita s PHA nije ovisila o dobi ni u djece mlađe od dvije godine ( $r=0,281$ ,  $p=0,031$ ) ni u djece starije od dvije godine ( $R=-0,047$ ,  $p=0,714$ ), Slika 26.
10. Koncentracija IFN- $\gamma$  nakon stimulacije limfocita s mikobakterijskim antigenima nije ovisila o dobi ni u djece mlađe od dvije godine ( $r=0,166$ ,  $p=0,202$ ) ni u djece starije od dvije godine ( $R=-0,061$ ,  $p=0,637$ ), Tablica 20.
11. Ukupna sukladnost TST-a i IFN- $\gamma$  postojala je u 85% djece (oba pozitivna testa pozitivna u 15% djece, oba negativna testa u 70% djece),  $\kappa = 0,588$ , Tablica 16.
12. Granična vrijednost koncentracije IFN- $\gamma$  od  $0,35$  IU/mL imala je dijagnostičku osjetljivost 64%, dijagnostičku specifičnost 91%, PPV 69% i NPV 90%.



13. Određivanje koncentracije IFN- $\gamma$  može doprinijeti preciznijoj dijagnostici LTBI u imunokompetentne djece mlađe od pet godina, poglavito u djece s nesukladnim rezultatima TST-a i IFN- $\gamma$ .

## 7. SAŽETAK

Uvod: Određivanje koncentracije IFN- $\gamma$  nakon stimulacije limfocita s antigenima mikobakterija tuberkuloze omogućuje ispitivanje staničnog imunološkog odgovora u imunokompetentne djece koja su zbog bliskog kontakta s odraslom oboljelom osobom, inficirane s *M. tuberculosis*.

Ciljevi: 1. odrediti utjecaj epidemioloških čimbenika na koncentraciju IFN- $\gamma$ , 2. ispitati utjecaj rizika infektivnih indikatora na pojavu latentne tuberkulozne infekcije (LTBI), 3. odrediti utjecaj dobi na koncentraciju IFN- $\gamma$ , te 4. odrediti podudarnost nalaza IFN- $\gamma$  i rezultata TST-a.

Materijal i metode: Uključena su BCG-irana djeca u dobi do 5 godina, koja su zbog kontakta s bolesnikom oboljelim od tuberkuloze bila upućena radi otkrivanja LTBI-a. Tuberkulinski kožni test proveden je s 2 jedinice standardizirane otopine PPD-a (Tuberkulin PPD RT23, Statens Serum Institute, Copenhagen, Danska) metodom Mantoux-a, a veličina induracije očitavala se nakon 72 sata. Koncentracija IFN- $\gamma$  izmjerena je metodom ELISA nakon inkubacije limfocita s antigenima mikobakterija tuberkuloze (peptidi ESAT-6, CFP-10 i TB7.7). Primijenjena je metoda QuantiFERON-TB Gold In Tube (Cellestis Ltd., Carnegie, Australija).

Rezultati: Na pojavu LTBI utjecali su: bliski kontakt s tuberkuloznim bolesnikom, nalaz kaverni u radiogramu pluća, nalaz acidorezistentnih bacila i nalaz mikobakterija tuberkuloze u biološkim uzorcima odraslih osoba iz kontakta s ispitivanom djecom. Koncentracija IFN- $\gamma$  nije ovisila o dobi djece. Ukupna sukladnost TST-a i IFN- $\gamma$  postojala je u 85% djece (koeficijent sukladnosti,  $\kappa = 0,588$ ).

Zaključak: Određivanje koncentracije IFN- $\gamma$  može doprinijeti preciznijoj dijagnostici LTBI u imunokompetentne djece mlađe od pet godina, poglavito u djece s nesukladnim rezultatima TST-a i IFN- $\gamma$ .

Ključne riječi: djeca, interferon-gama, latentna tuberkulozna infekcija

## 8. SUMMARY

### **Diagnostic value of interferon gamma from lymphocytes of children under five years with latent tuberculosis infection**

Background: Determination of concentration of IFN- $\gamma$  released from T lymphocytes upon stimulation with *M. tuberculosis*-specific antigens allows testing of cellular immune response in immunocompetent children who are infected with *M. tuberculosis* because of exposure to a case of active TB.

Aims: 1) to assess the influence of epidemiological factors on the concentration of IFN- $\gamma$ , 2) to assess the influence of infectivity of adult source case on the occurrence of LTBI, 3) to investigate the impact of age on results of IFN- $\gamma$ , and 4) to determine the agreement between IFN- $\gamma$  and TST results.

Subjects and methods: We investigated children who had received compulsory BCG vaccination at birth because of history of exposure to a case of TB. TST was performed with two tuberculin units of standardized purified protein derivative (PPD) solution (Tuberculin PPD RT 23, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) by Mantoux method and transverse induration was measured 72 hours later. IFN- $\gamma$ , using a commercial QuantiFERON-TB Gold In Tube test (Cellestis Ltd., Carnegie, Australia) was measured by ELISA method after the stimulation of T lymphocytes with *M. tuberculosis*-specific antigens (ESAT-6, CFP-10 and TB7.7).

Results: The results of the study demonstrate that the presence of cavitory lesions in adult source case, close contact with adult source case, AFB smear positivity status and positive culture status were associated with occurrence of LTBI in children. There was no

evidence of age having impact on the concentration of IFN- $\gamma$ . A moderate concordance between TST and IFN- $\gamma$  was confirmed (85%,  $\kappa = 0,588$ ).

Conclusion: Determination of IFN- $\gamma$  may contribute to more precise diagnosis of LTBI in immunocompetent children less than five years of age, especially in children with discordant TST and IFN- $\gamma$  results.

Key words: children, interferon gamma, latent tuberculosis infection

## 9. LITERATURA

1. WHO. Global tuberculosis control: WHO report 2011. Dostupno na: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2011/gtbr11\\_full.pdf](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf). Datum posljednjeg pristupa: 5. veljače 2012.
2. Malik S, Schurr E. Genetic susceptibility to tuberculosis. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:863-8.
3. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Epidemiologija tuberkuloze. U: Baklaić Ž, Dečković-Vukres V, Kuzman M, ur. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2010. godinu. Zagreb: HZJZ; 2011, str. 195-7.
4. Falzon D, Ait-Belghiti F. What is tuberculosis surveillance in the European Union telling us? *Clin Infect Dis* 2007;44:1261-7.
5. Rothel SJ, Andersen P. Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2005;3:981-93.
6. Shingadia D, Novelli V. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children. *Lancet Infect Dis* 2003;3:624-32.
7. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, i sur. The natural history of childhood intrathoracic tuberculosis: a critical review of literature from the pre-chemotherapy era. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004;8:392-402.
8. Marais BJ, Pai M. Recent advances in the diagnosis of childhood tuberculosis. *Arch Dis Child.* 2007;92:446-52.
9. Aberle N, Boranić M. Imunološki aspekti tuberkuloze u djece. *Paediatr Croat* 2005;49(Supl 1):102-6.
10. Pavlović M, Peroš-Golubičić T. Tuberkuloza. U: Vrhovac B, Jakšić B, Labar B, Vucelić B, ur. *Interna medicina*. Zagreb: Naklada Ljevak d.o.o.; 2003, str. 1559-70.
11. Young DB, Kaufmann SH, Hermans PW, Thole JE. Mycobacterial protein antigens: a compilation. *Mol Microbiol* 1992;6:133-45.
12. Andersen P, Askgaard D, Ljungquist L, Bennedsen J, Heron I. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun* 1991;59:1905-10.
13. Farer LS, Lowell LM, Meador MP. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. *Am J Epidemiol* 1979;109:205-17.
14. Rook GA, Zumla A. Advances in the immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 2001;7:116-23.
15. Van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:294-309.
16. Mack U, Migliori GB, Sester M, i sur. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune response to *M. Tuberculosis*? A TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 2009;33:956-73.
17. Lewinsohn DA, Gennaro ML, Scholvinck L, Lewinsohn DM. Tuberculosis immunology in children: diagnostic and therapeutic challenges and opportunities. *Int. J Tuberc Lung Dis.* 2004;8:658-74.
18. Rook GAW, Seah G, Ustinowski A. *M. tuberculosis*: immunology and vaccination. *Eur Respir J* 2001;17:537-57.

19. Zahrt TC. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Mycrobes Infect* 2003;5:159-67.
20. Kaufman SHE. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Rev* 2001;1:20-30.
21. Skeieky YAW, Sadoff JC. Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nature Rev Microbiol* 2006;4: 469-76.
22. Cooper AM, Khader SA. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunol Rev* 2008;226:191-204.
23. Ahmad S. Pathogenesis, immunology and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Dev Immunol* 2011;2011:814943.
24. Martino A. *Mycobacteria* and innate cells: critical encounter for immunogenicity. *J Biosc* 208;33:137-44.
25. Chan J, Flynn J. The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clin Immunol* 2004;110:2-12.
26. Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Ann Rev Immunol* 2009;27:393-422.
27. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, i sur. An antimicrobial activity of cytolytic T cell mediate by granulysin. *Science* 1998;282:121-5.
28. Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, i sur. Toll-like receptor 2-dependant inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19 kD lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2001;167:910-8.
29. Gehring AJ, Dobos KM, Belisle JT, Harding CV, Boom WH. *Mycobacterium tuberculosis* LprG (Rv1411c): a novel TLR2 ligand that inhibits human macrophage class II antigen processing. *J Immunol* 2004;173:2660-8.
30. Kang SJ, Cresswell P. Saposins facilitate CD1d-restricted presentation of an exogenous lipid antigen to T cells. *Nat Immunol* 2004;5:175-81.
31. Barral DC, Brenner MB. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat Rev Immunol* 2007;7:929-41.
32. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004;120:213-32.
33. Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:569-77.
34. Pathak SK, Basu S, Bhattacharyya A, Pathak S, Kundu M, Basu J. *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated IRAK-M induction negatively regulates Toll-like receptor-dependent interleukin-12 p40 production in macrophages. *J Biol Chem* 2005;280:42794-800.
35. Garg A, Barnes P, Roy S, i sur. Mannose-capped lipoarabinomannan- and prostaglandin E2-dependent expansion of regulatory T cells in human *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur J Immunol* 2008;38:459-69.
36. Sibley LD, Adams LB, Krahenbuhl JL. Inhibition of interferon gamma-mediated activation in mouse macrophages treated with lipoarabinomannan. *Clin Exp Immunol* 1990;80:141-8.
37. Chatterjee D, Khos KH. *Mycobacterial* lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology* 1998;8:113-20.
38. Relijic R, Ivanyi J. A case for passive immunoprophylaxis against tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2006;6:813-8.

39. Cho S, Mehra V, Thoma-Uszynski S, i sur. Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8<sup>+</sup> T cells in human tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12210-5.
40. Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, i sur. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science* 1997;276:1684-7.
41. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis* 2003;3:578-90.
42. Gonzalez-Juarrero M, Turner OC, Turner J, Marietta P, Brooks JV, Orme IM. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2001;69:1722-8.
43. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol* 2007;5:39-47.
44. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol* 2012;12:352-66.
45. Orme IM, Cooper AM. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunol Today* 1999;20:307-12.
46. Sundaramurthy V, Pieters J. Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages. *Microbes Infect* 2007;9:1671-9.
47. Young DB, Gideon HP, Wilkinson RJ. Eliminating latent tuberculosis. *Trends Microbiol* 2009; 17:193-8.
48. Barry CE, Boshoff HI, Dartois V, i sur. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:845-55.
49. Via LE, Lin PL, Ray SM, i sur. Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits and nonhuman primates. *Infect Immun* 2008;76:2333-40.
50. Rustad TR, Sherrid AM, Minch KJ, Sherman DR. Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. *Cell Microbiol* 2009;11:1151-9.
51. Kumar A, Deshane JS, Crossman, i sur. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide induces the *Mycobacterium tuberculosis* dormancy regulon. *J Biol Chem* 2008;283:18032-9.
52. Jin J, Sun L, Jiao W, i sur. SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene polymorphisms associated with pediatric tuberculosis in China. *Clin Infect Dis* 2009;48:733-8.
53. Hackam DJ, Rotstein OD, Zhang W, Gruenheid S, Gros P, Grinstein S. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification. *J Exp Med* 1998;188:351-64.
54. Lang T, Prina E, Sibthorpe D, Blackwell JM. Nramp1 transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on antigen processing and presentation. *Infect Immun* 1997;65:380-6.
55. Kuhn DE, Lafuse WP, Zwilling BS. Iron transport into *Mycobacterium avium*-containing phagosomes from an Nramp1(Gly169)-transfected RAW264.7 macrophage cell line. *J Leukoc Biol* 2001;69:43-9.
56. Skamene E, Schurr E, Gros P. Infection genomics: Nramp1 as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. *Annu Rev Med* 1998;49:275-87.



57. Govoni G, Gros P. Macrophage *NRAMP1* and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm Res* 1998;47:277-84.
58. Kato-Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR, i sur. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res* 2001;11:547-54.
59. Altare F, Durandy A, Lammas D, i sur. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* 1998;280:1432-5.
60. de Jong R, Altare F, Haagen IA, i sur. Severe mycobacterial and *Salmonella* infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. *Science* 1998;280:1435-8.
61. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Altare F, i sur. Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J Clin Invest* 1997;100:2658-64.
62. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D, i sur. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genet* 1999;21:370-8.
63. Lokar-Kolbas R, Reiner-Banovac Ž, Richter D. Bolesti dišnoga sustava. U: Zergollern Lj, Reiner-Banovac Ž, Barišić I, Richter D, Votava-Raić A, ur. *Pedijatrija*. Zagreb: Naprijed; 1994, str. 767.
64. Starke JR. Tuberculosis in children. *Semin Respir Crit Care Med* 2004;25:353-64.
65. Marais BJ, Gie RP, Hesselning AC, i sur. A refined symptom-based approach to diagnose pulmonary tuberculosis in children. *Pediatrics* 2006;118:1350-9.
66. Zoričić-Letoja I, Kristić-Kirin B. Aktualnosti u dijagnostici i liječenju tuberkuloze dječje i adolescentne dobi. *Paediatr Croat* 2001;45:107-11.
67. Katalinić-Janković V. Mjesto mikrobioloških metoda u otkrivanju i praćenju tuberkuloze. U: Popović-Grle S, ur. *Tuberkuloza-ponovni izazov medicini na početku trećeg tisućljeća*. Zagreb; Klinika za plućne bolesti „Jordanovac“, Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske, Institut Otvoreno društvo Hrvatska; 2004, str. 51-3.
68. Raos M, Marković J, Dodig S. Epidemiološke i kliničke značajke tuberkuloze u djece u dobi do sedam godina liječene u dječjoj bolnici Srebrnjak. *Paediatr Croat* 2008;52: 93-7.
69. Katalinić-Janković V. Put prema boljoj i bržoj dijagnostici tuberkuloze. U: Dodig S, Zrinski Topić R, ur. *Zajedno protiv dječje tuberkuloze*. Zagreb: Dječja bolnica Srebrnjak, Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2010, str. 10-1.
70. Zoričić-Letoja I. Osobitosti dječje i adolescentne tuberkuloze. U: Dodig S, Zrinski Topić R, ur. *Zajedno protiv dječje tuberkuloze*. Zagreb: Dječja bolnica Srebrnjak, Hrvatski zavod za javno zdravstvo; 2010, str. 7-9.
71. Kovač K, Raos M, Koncul I, Bela Klancir S. Kliničke osobitosti dječje tuberkuloze u prve tri godine života. *Paediatr Croat* 1999;43:191-6.
72. McAdams HP, Erasmus J, Winter JA. Radiologic manifestations of pulmonary tuberculosis. *Radiol Clin Nort Am* 1995;33:655-78.
73. Weismuller MM, Graham SM, Claessens NJ, Meijnen S, Salaniponi FM, Harries AD. Diagnosis of childhood tuberculosis in Malawi: an audit of hospital practice. *In J Tuberc Lung Dis* 2002;5:432-8.

74. Milković Đ, Richter D, Zoričić-Letoja I, Raos M, Koncul I. Chest radiography findings in primary pulmonary tuberculosis in children. *Coll Antropol* 2005;29:271-6.
75. Kim WX, Choi JI, Cheon JE, Kim IO, Yeon KM, Lee HJ. Pulmonary tuberculosis in infants: radiographic and CT findings. *Am J Roentgenol* 2006;187:1024-33.
76. Raos M, Batinica S, Marković J, Verona E. Tumorozni oblik plućne tuberkuloze u djeteta: prikaz slučaja. *Med Jad* 2007;37:91-4.
77. Marais BJ, Gie RP, Schaff HS, i sur. A proposed radiological classification of childhood intrathoracic tuberculosis. *Pediatr Radiol* 2004;34:886-94.
78. Katalinić-Janković V. Novosti u mikrobiološkoj dijagnostici tuberkuloze. U: Dodig S, Zrinski Topić R, ur. Tuberkulozna infekcija u djece. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu-Medicinski fakultet, Dječja bolnica Srebrnjak; 2009, str. 11-3.
79. Starke JR: Pediatric tuberculosis: time for a new approach. *Tuberculosis* 2003;83:208-12.
80. Theart AC, Marais BJ, Gie RP, Hesselning AC, Beyers N. Criteria used for the diagnosis of childhood tuberculosis at primary health care level in a high-burden urban setting. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:594-603.
81. Balabanić-Kamauf B. Mikrobiološke pretrage tuberkuloze i pneumonija. U: Peroš-Golubičić T, Pavlović M, ur. Tuberkuloza, pneumonija, pneumonitis-upalne bolesti plućnog parenhima. Zagreb: Medicinska naklada; 2002, str. 21-34.
82. Starke JR, Smith MHD. Tuberculosis. U: Feign RD, Cherry JD, ur. Textbook of pediatric infectious diseases. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998, str. 1196-239.
83. Popović-Grle S. Tuberkuloza kao globalni medicinski problem. U: Popović-Grle S, ur. Tuberkuloza, ponovni izazov liječnicima na početku trećeg tisućljeća. Zagreb: Klinika za plućne bolesti „Jordanovac“, Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske, Institut Otvoreno društvo Hrvatska; 2004, str. 13-5.
84. Cardona PJ. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection* 2009;37:80-6.
85. Cardona PJ. New insights on the nature of latent tuberculosis infection and its treatment. *Infl All Drug Targ* 2007;6:27-39.
86. Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y, i sur. Foamy macrophages from tuberculous patients granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PloS Pathogens* 2008;4:1-14.
87. Wiker HG, Mustafa T, Bjune GA, Harboe M. Evidence for waning of latency in a cohort study of tuberculosis. *BMC Infect Dis* 2010;10:1-10.
88. Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi, Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Naputak za suzbijanje i sprečavanje tuberkuloze. 2. izd. Zagreb: Uvez d.o.o.; 2010, str. 60-77.
89. Wang L, Turner MO, Elwood RK, Schulzer M, FitzGerald JM. A meta-analysis of the effect of bacille Calmette-Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax* 2002;57:804-9.
90. Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, Gottschalk R, Nienhaus A. Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In

- Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest* 2009;135:1010-8.
91. Kang YA, Lee HW, Yoon HI, i sur. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon  $\gamma$  assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA* 2005;293:2756-61.
  92. Lalvani A, Thillai M. Diagnosis of tuberculosis: principles and practice of using interferon- $\gamma$  release assays (IGRAs). *Breathe* 2009;5:303-9.
  93. Andersen P, Munk ME, Doherty TM, i sur. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000;356:1099-104.
  94. Chun JK, Kim CK, Kim HS, i sur. The role of whole blood interferon gamma assay for the detection of latent tuberculosis infection in bacille Calmette-Guerin vaccinated children. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;62:389-94.
  95. Detjen AK, Keil T, Roll S, i sur. Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2007;45:322-8.
  96. Diel R, Nienhaus A, Lange C, Meywald-Walter K, Forssbohm M, Schabert G. Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res* 2006;7:77.
  97. Zrinski Topić R, Dodig S. Laboratorijska dijagnostika latentne tuberkulozne infekcije. U: Dodig S, Zrinski Topić R, ur. *Zajedno protiv dječje tuberkuloze. Dječja bolnica Srebrnjak, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb*, 2010;15-6.
  98. Amanatidou V, Syridou G, Mavrikou M, Tsolia MN. Latent tuberculosis infection in children: diagnostic approaches. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:1285-94.
  99. Pai M, Zwerlig A, Menzies D. Systematic review: T-cell based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection – an update. *Ann Intern Med* 2008;149:177-84.
  100. Zrinski Topić R. Latent tuberculosis infection. *RAD HAZU* 2012;37:9-18.
  101. Denkinger CM, Dheda K, Pai M. Guidelines on interferon- $\gamma$  release assays for tuberculosis infection: concordance, discordance or conclusion? *Clin Microbiol Infect* 2011;17:806-14.
  102. TB (partial update) short clinical guideline DRAFT (July 2010) National Institute for Health and Clinical Excellence (2010) Tuberculosis: interferon gamma tests for the diagnosis of latent tuberculosis. London: National Institute for Health and Clinical Excellence. Dostupno na: [www.nice.org.uk/CG\[XX\]](http://www.nice.org.uk/CG[XX]) Datum posljednjeg pristupa: 14. travnja 2012.
  103. Centers for Disease Control and Prevention. Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection. United States. *MMWR* 2010;59:1-25.
  104. American Academy of Pediatrics. Tuberculosis. U: Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS, ur. *Red book: 2009 report of the Committee on Infectious Disease*. 28.izd. IL: Elk Grove Villiage; 2009, str. 680-701.
  105. European Centre for Disease Prevention and Control. Use of interferon-gamma release assays in support of TB diagnosis. Stockholm: ECDC; 2011.

106. International Union Against Tuberculosis Committee on Prophylaxis. Efficacy of various durations of isoniazid preventive therapy for tuberculosis: five years of follow-up in the IUAT trial. *Bull World Health Org* 1982;60:555-64.
107. 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.
108. American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:221-47.
109. Menzies D, Al Jahdali H, Al Otaibi B. Recent developments in treatment of latent tuberculosis infection. *Indian J Med Res* 2011;133:257-66.
110. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *World Med J* 2008;54:122-5.
111. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, i sur. Specific detection of tuberculosis infection. An interferon-gamma-based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:59-64.
112. Marusteri M, Bacarea V. Comparing groups for statistical differences: How to choose the right statistical test? *Biochem Med* 2010;20:15-32.
113. Lewinsohn DA, Zalwango S, Stein CM, i sur. Whole blood interferon-gamma responses to Mycobacterium tuberculosis antigens in young household contacts of persons with tuberculosis in Uganda. *PLoS ONE* 2008;3:3407.doi:10.1371/journal.pone.0003407
114. Pavić I, Zrinski Topić R, Raos M, Aberle N, Dodig S. Interferon- $\gamma$  release assay for the diagnosis of latent tuberculosis in children younger than 5 years of age. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30:866-70.
115. Leung CC. Screening contacts of tuberculosis overcoming obstacles with an old tool. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:939-40.
116. Tissot F, Zanneti 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.
117. Kanf YA, Lee HW, Yoon HI, i sur. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole interferon- $\gamma$  assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA* 2005;293:2756-61.
118. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1376-95.
119. AAP. Tuberculosis. U: Pickering LK, ed. *Red Book: 2006 Report of the Committee on infectious diseases*. 27th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of pediatrics; 2006:678-98.
120. Childhood TB Sub-group. Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children. Geneva: WHO; 2006.
121. Okada K, Mao TE, Mori T, i sur. Performance of an interferon-gamma release assay for diagnosing latent tuberculosis infection in children. *Epidemiol Infect* 2008;136:1179-87.

122. Diel R, Goletti D, Ferrara G, i sur. Interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2011;37:88-99.
123. Tsoia MN, Mavrikou M, Cristelis E, i sur. Whole blood interferon gamma release assay is a useful tool for the diagnosis of tuberculosis infection particularly among Bacille Calmette Guerin-vaccinated children. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:1137-40.
124. Ling DI, Zwerling AA, Steingart KR, Pai M. Immune-based diagnostics for TB in children: what is the evidence? *Paediatr Respir Rev* 2011;12:9-15.
125. 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.
126. Kampmann B, Whittaker E, Williams A, i sur. Interferon- $\gamma$  release assays do not identify more children with active tuberculosis than tuberculin skin test. *Eur Resp J* 2009;33:1374-82.
127. Connell TG, Curtis N, Ranganathan SC, i sur. Performance of a whole blood interferon gamma assay for detecting latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* in children. *Thorax* 2006;61:616-20.
128. Bianchi L, Galli L, Moriondo M, i sur. Interferon-gamma release assay improves the diagnosis of tuberculosis in children. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:510-4.
129. Richeldi L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:736-42.
130. Judson FN, Feldman RA. Mycobacterial skin tests in humans 12 years after infection with *Mycobacterium marinum*. *Am Rev Respir Dis* 1974;109:544-7.
131. Brodie B, Lederer DJ, Gallardo JS, i sur. Use of an interferon- $\gamma$  release assay to diagnose latent tuberculosis infection in foreign-born patients. *Chest* 2008;133:869-74.
132. Soborg B, Ruhwald M, Hetland ML, i sur. Comparison of screening procedures for *Mycobacterium tuberculosis* infection among patients with inflammatory diseases. *J Rheumatol* 2009;36:1876-84.
133. Arend SM, Thijsen SF, Leyten EM, i sur. Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:618-27.
134. Hill PC, Brookes RH, Adetifa IM, i sur. Comparison of enzyme-linked immunospot assay and tuberculin skin test in healthy children exposed to *Mycobacterium tuberculosis*. *Pediatrics* 2006;117:1542-8.
135. Lighter J, Rigaud M, Eduardo R, i sur. Latent tuberculosis diagnosis in children by using QuantiFERON-TB Gold In-tube test. *Pediatrics* 2009;123:30-7.
136. Kampmann B, Tena-Coki G, Anderson S. Blood tests for diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2006;368:282-3.
137. Dogra S, Narang P, Mandiratta DK, i sur. Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with the tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect* 2007;54:267-76.
138. Clinical Experience with QuantiFERON-TB Gold (In-Tube). Dostupno na: <http://www.cellestis.com>. Datum posljednjeg pristupa 13. siječnja 2011.

139. Kobashi Y, Mouri K, Obase Y, i sur. Clinical evaluation of QuantiFERON TB-2G test for immunocompromised patients. *Eur Respir J* 2007;30:945-50.
140. CDC Guidelines for Using the QuantiFERON®-TB Gold Test for Detecting Mycobacterium tuberculosis Infection, United States. *MMWR Recomm Rep* 2005;54:49-55.
141. Nenadić N, Kristić Kirin B, Zoričić Letoja I, Plavec D, Zrinski Topić R, Dodig S. Serial Interferon- $\gamma$  release assay in children with latent tuberculosis infection and children with tuberculosis. *Pediatr Pulmonol* 2011;47:401-8.
142. Pai M. Spectrum of latent tuberculosis-existing tests cannot resolve the underlying phenotypes. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:242-3.
143. Pai M, Joshi R, Dogra S, i sur. T-cell assay conversions and reversions among household contacts of tuberculosis patients in rural India. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:84-92.
144. Ringshausen FC, Nienhaus A, Schablon A, Schlösser S, Schultze-Werninghaus G, Rohde G. Predictors of persistently positive Mycobacterium tuberculosis-specific interferon-gamma responses in the serial testing of health care workers. *BMC Infect Dis* 2010;10:220.
145. Veerapathran A, Joshi R, Goswami K, i sur. T-cell assays for tuberculosis infection: Deriving cut-offs for conversion using reproducibility data. *PloS ONE* 2008;3:e850. DOI: 10.1371/journal.pone.0001850.
146. 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.
147. Bergamini BM, Losi M, Vaienti F, i sur. Performance of commercial blood tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection in children and adolescents. *Pediatrics* 2009;123:419-24.
148. Connell TG, Ritz N, Paxton GA, Buttery JP, Curtis N, Ranganathan SC. A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB Gold and T-SPOT.TB in children. *Plos ONE* 2008;3:e2624.
149. Haustein T, Ridout DA, Hartley JC, i sur. The likelihood of an indeterminate test result from a whole-blood interferon- $\gamma$  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.
150. Brooks BM, Flanagan BF, Thomas AL, Coleman JW. Penicillin conjugates to interferon-gamma and reduces its activity: a novel drug-cytokine interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:1175-81.
151. Downing JF, Martinez-Valdez H, Elizondo RS, Walker EB, Taylor MW. Hyperthermia in humans enhance interferon-gamma synthesis and alters the peripheral lymphocyte population. *J Interferon Res* 1988;8:143-50.
152. Huang YH, Haegerstrand A, Frostegard J. Effects of in vitro hyperthermia on proliferative responses and lymphocyte activity. *Clin Exp Immunol* 1996;103:61-6.
153. Manuel O, Humar A, Preiksaitis J, i sur. Comparison of Quantiferon-TB Gold with tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection prior to liver transplantation. *Am J Transplant* 2007;7:2797-801.

154. Luetkemeyer AF, Charlebois ED, Flores LL, i sur. Comparison of an interferon-gamma release assay with tuberculin skin testing in HIV-infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:737-42.
155. 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.
156. Teixeira LK, Fonseca BPF, Barboza BA, Viola JPB. The role of interferon- $\gamma$  on immune and allergic responses. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100Supl I:137-44.
157. 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.
158. Diel R, Loddenkemper 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.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 18. prosinca 1972. godine u Sinju, gdje sam završio osnovnu i srednju školu. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirao sam 1998. godine. Za vrijeme studija jednu sam godinu bio demonstrator u Zavodu za kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nakon pripravničkog staža, radio sam u Centru za dijalizu Doma zdravlja-Sinj, te Ambulanti opće medicine-Ivankovo Doma zdravlja-Vinkovci. Od 2002.-2008. godine specijalizirao sam pedijatriju u Klinici za pedijatriju KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nakon položenog specijalističkog ispita radio sam u svojstvu specijaliste pedijatra u Općoj bolnici-Vinkovci, Dječjoj bolnici-Srebrnjak, a od 6.12.2010. godine u Klinici za dječje bolesti-Zagreb u Zavodu za pulmologiju, alergologiju, imunologiju i reumatologiju. Pohađao sam i završio poslijediplomski stručni studij „Klinička pedijatrija“ i poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te stekao uvjete za prijavu doktorske disertacije.

Stručno sam se usavršavao na tuzemnim i inozemnim tečajevima i to poglavito iz područja pedijatrijske pulmologije, a u nekima sam i aktivno sudjelovao. Do sad sam, kao autor i koautor, objavio 11 znanstvenih i stručnih radova: od toga osam u časopisima indeksiranim u CC, te tri u časopisima indeksiranim u drugim bazama.

Prijavom i izradom rada iz latentne tuberkulozne infekcije želim dati doprinos boljem razumijevanju utjecaja izloženosti djece mlađe od pet godina u kontaktu s bolesnicima koji boluju od aktivne tuberkuloze.



Član sam Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog pedijatrijskog društva, Hrvatskog društva za pedijatrijsku pulmologiju i Europskog respiratornog društva.