

Neodrediv rezultat testa oslobađanja interferona gama u dječjoj dobi - pregled literature s prikazom bolesnika

Ivan Pavić¹, Dorian Tješić Drinković², Jasna Čepin Bogović¹, Slavica Dodig³

Testovi oslobađanja interferona gama (IGRA-testovi) značajan su napredak u dijagnostici infekcije s bakterijom M. tuberculosis. Osim dobivanja negativnog i pozitivnog rezultata IGRA-testa, postoji mogućnost dobivanja neodredivog rezultata, odnosno situacije kad nije moguće odrediti stanje infekcije s M. tuberculosisom. Interpretacija i odgovarajuće praćenje djece s neodredivim rezultatima IGRA-testa dijagnostički su izazov za kliničara. Cilj ovog preglednog članka je kroz prikaz slučaja 15-mjesečnog djeteta s prolaznim neodredivim nalazom QuantiFERON-TB Gold In-Tube testa (QFT-GIT, Cellestis Ltd, Carnegie, Australija) u tijeku akutne upale pluća uputiti na probleme vezane za dobivanje neodredivog rezultata. Nakon izlječenja nalaz QFT-GIT-testa bio je negativan. Da bi se smanjio udio neodredivih rezultata i time nepotrebni troškovi QFT-GIT-test je preporučljivo izvoditi nakon sanacije akutne upale uz obveznu standardizaciju predanalitičkih i analitičkih postupaka. S obzirom na sve širu upotrebu IGRA-testova nameće se sve veća potreba za smjernicama koje su temeljene na dokazima o optimalnom praćenju djece s neodredivim rezultatima IGRA-testa.

Ključne riječi: testovi oslobađanja interferona gama; *Mycobacterium tuberculosis*; dojenče

UVOD

Mycobacterium (M.) tuberculosis je među vodećim infektivnim uzročnicima smrtnosti širom svijeta, sa 8,7 milijuna novooboljelih tijekom 2011. godine (1). Profilaktičko liječenje osoba s dokazanom latentnom tuberkuloznom infekcijom (LTBI) najučinkovitija je metoda prevencije progresije u aktivnu bolest i daljnjeg širenja *M. tuberculosis* u populaciji (2). Tuberkulinski kožni test (eng. *tuberculin skin test*, TST) metoda je *in vivo* koja se već više od sto godina primjenjuje u dijagnozi LTBI-a, no zbog snižene osjetljivosti (utjecaj imunosnog statusa bolesnika, subjektivno očitavanje rezultata) i specifičnosti (utjecaj prethodnog BCG-cjepiva, kontakt s netuberkuloznim mikobakterijama, booster efekt, subjektivno očitavanje rezultata) nije u potpunosti pouzdan (3). Recentna otkrića na području imunologije tuberkuloze pridonijela su razvoju novih testova kojima se s većom pouzdanošću može dijagnosticirati infekcija s *M. tuberculosisom* (4). Riječ je o testovima oslobađanja interferona gama (IFN- γ) (eng. *interferon-gamma release assay*, IGRA) što se temelje na metodama *ex vivo* kojima se potiče oslobađanje IFN- γ iz limfocita T nakon podražaja s antigenima specifič-

nima za *M. tuberculosis* (5). Tu pripadaju ESAT-6 (eng. *early secretory antigenic target-6-specific T cells*), CFP-10 (eng. *culture filtrate protein-10*) i TB7.7(p4) koji nisu prisutni ni u jednom BCG-soju niti u većine netuberkuloznih mikobakterija (NTM), pa stimulacija limfocita T smjesom navedenih antigena neće rezultirati oslobađanjem IFN- γ u zdravih osoba koje su primile BCG-cjepivo i onih inficiranih s većinom NTM-a (5). Od dva komercijalna IGRA-testa dostupna na globalnom tržištu: QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT, Cellestis Ltd, Carnegie, Australija) i T-SPOT.TB (Oxford Immunotec Ltd, Oxford, Velika Britanija), QFT-GIT je registriran u Hrvatskoj.

Velika prednost IGRA-testova je u mogućnosti određivanja pozitivne i negativne kontrole, čime je vjerojatnost dobi-

¹ Klinika za pedijatriju, Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zagreb

² Klinika za pedijatriju, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb

³ Dječja bolnica Srebrnjak

Adresa za dopisivanje:

Dr. sc. Ivan Pavić, dr. med., Klinika za pedijatriju, Klinika za dječje bolesti Zagreb, Klaićeva 16, 10000 Zagreb, E-mail: ipavic01@gmail.com

Primljeno/Received: 8. 7. 2013., Prihvaćeno/Accepted: 4. 10. 2013.

TABLICA 1. Prikaz istraživanja primjene QuantiFERON-TB Gold In-Tube testa u djece

| Autor/godina | Broj djece | Država istraživanja | | Broj neodredivih testova | Postotak neodredivih testova |
|-------------------------------|------------|---------------------|----------------------|--------------------------|------------------------------|
| | | Podatci | Iz svježih uzoraka | | |
| Tsiouris i sur./2006 (8) | 184 | | Južnoafrička Rep. | 0 | 0 |
| Chun i sur./2008 (9) | 227 | | Južna Koreja | 19 | 8,37 |
| Connel i sur./2008 (10) | 100 | | Australija | 3 | 3 |
| Diel i sur./2008 (11) | 66 | | Njemačka | 0 | 0 |
| Dominguez i su./2008 (12) | 134 | | Španjolska | 0 | 0 |
| Mandalakas i sur./2008 (13) | 23 | | Južnoafrička Rep. | 0 | 0 |
| Petrucci i sur./2008 (14) | 146 | | Nepal | 5 | 3,42 |
| Baker i sur./2009 (3) | 55 | | SAD | 0 | 0 |
| Bergamini i sur./2009 (15) | 315 | | Italija | 15 | 4,76 |
| Bianchi i sur./2009 (16) | 336 | | Italija | 2 | 0,60 |
| Diel i sur./2009 (17) | 107 | | Njemačka | 1 | 0,93 |
| Kampmann i sur./2009 (18) | 209 | | Engleska | 14 | 6,70 |
| Lighter i sur./2009 (2) | 207 | | SAD | 3 | 1,45 |
| Lighter i sur./2009 (19) | 127 | | SAD | 0 | 0 |
| Stavri i sur./2010 (20) | 60 | | Rumunjska | 18 | 30 |
| Altet-Gómez i sur./2011 (21) | 166 | | Španjolska | 0 | 0 |
| Borgia i sur./2011 (22) | 1340 | | Italija | 3 | 0,22 |
| Debord i sur./2011 (23) | 19 | | Francuska | 0 | 0 |
| Kasambira i sur./2011 (24) | 270 | | Južnoafrička Rep. | 19 | 7,04 |
| Kwakernaak i sur./2011 (25) | 56 | | Nizozemska | 0 | 0 |
| Losi i sur./2011 (26) | 232 | | Italija | 3 | 1,30 |
| Nenadić i sur./2011 (27) | 59 | | Hrvatska | 0 | 0 |
| Pavić i sur./2011 (28) | 142 | | Hrvatska | 1 | 0,70 |
| Shah i sur./2011 (29) | 270 | | Južnoafrička Rep. | 17 | 6,30 |
| Thomas i sur./2011 (30) | 283 | | Engleska | 18 | 6,36 |
| Zrinski Topić i sur./2011 (6) | 2173 | | Hrvatska | 10 | 0,46 |
| Alsleben i sur./2012 (31) | 48 | | Njemačka | 0 | 0 |
| Basu Roy i sur./2012 (32) | 1093 | | multicentrična | 20 | 1,83 |
| Kabeer i sur./2012 (33) | 145 | | Indija | 0 | 0 |
| Knappik i sur./2012 (34) | 80 | | Njemačka | 0 | 0 |
| Rutherford i sur./2012 (35) | 304 | | Indonezija | 9 | 2,96 |
| Rutherford i sur./2012 (36) | 371 | | Indonezija | 10 | 2,70 |
| Pavić/2013 (4) | 121 | | Hrvatska | 0 | 0 |
| | | Podatci | Iz zamrznutih | Uzoraka plazme | |
| Dogra i sur./2007 (37) | 105 | | Indija | 0 | 0 |
| Thomas i sur./2010 (38) | 302 | | Bangladeš | 74 | 24,5 |
| Mahelai/2011 (39) | 718 | | Indija | 26 | 3,62 |
| Moyo i sur./2011 (40) | 397 | | Južnoafrička Rep. | 21 | 5,29 |
| Critselis i sur./2012 (41) | 761 | | Grčka | 23 | 3,02 |
| Onur i sur./2012 (42) | 97 | | Turska | 6 | 6,19 |
| Tuuminen i sur./2012 (43) | 60 | | Finska | 1 | 1,67 |
| Rose i sur./2013 (5) | 152 | | Tanzanija | 39 | 25,66 |
| Yassin i sur./2013 (44) | 458 | | Etiopija | 77 | 16,81 |
| Waisse i sur./2013 (45) | 245 | | Etiopija | 7 | 2,86 |
| Ukupno | 12763 | | | 464 | 3,64 |

vanja lažno negativnih i lažno pozitivnih rezultata testa svedena na najmanju moguću mjeru, osobito ako se slijede predanalitičke preporuke kod uzorkovanja krvi. Stimulacija limfocita T s mitogenom fitohemaglutininom (PHA) kao pozitivna kontrola služi za provjeru sposobnosti limfocita T da na adekvatan antigeni podražaj oslobode IFN- γ i za provjeru ispravnosti postupanja s uzorkom (6). Negativna kontrola bez stimulacije antigenima i mitogenom PHA daje uvid u koncentraciju IFN- γ prisutnu u cirkulaciji, neovisno o podražajima *ex vivo* (6). Osim nedvojbeno pozitivnog ili negativnog rezultata IGRA-testa, postoji mogućnost dobivanja neodredivog rezultata, odnosno stanja kad nije moguće odrediti koncentraciju IFN- γ (7). Do navedenoga dolazi u slučajevima povećane koncentracije IFN- γ u cirkulaciji (negativna kontrola >8 IU/L), smanjenog broja limfocita T ili smanjene sposobnosti limfocita T da otpuštaju IFN- γ (pozitivna kontrola <0,5 IU/L) (7). Znači, da bi se definirala pojavnost neodredivog rezultata, nužno je odrediti negativnu i pozitivnu kontrolu za svaki uzorak. Neodredivi rezultati IGRA-testa nisu česti, a interpretacija i odgovarajuće praćenje osoba s neodredivim rezultatom dijagnostički su izazov za kliničara. Prema dostupnim literaturnim podacima u imunokompetentne djece (Tablica 1), u kojima je obrađeno 12 763 ispitanika, udio neodredivih rezultata zadnje verzije IGRA-testova (QFT-GIT) iznosio je 3,64% (464/12763). U slučaju kad se plazma nakon inkubacije smrzavala, udio neodredivih rezultata QFT-GIT testa iznosio je 8,32% (274/3295), dok je udio neodredivih rezultata iz svježih uzoraka plazme iznosio 2,01% (190/9468).

Cilj je ovog članka prikazati slučaj 15-mjesečnog djeteta s prolaznim neodredivim nalazom QFT-GIT-testa u tijeku akutne upale pluća, kao polazištem za raspravu o uzrocima neodredivih rezultata.

Prikaz slučaja

Petnaestomjesečni dječak hospitaliziran je zbog kašlja i povišene tjelesne temperature u trajanju od 10 dana. Ambulantno je liječen fenoksimetilpenicilinom do dana prijma. Dječak je iz uredne trudnoće i porođaja, BCG-iran u rodilištu. Dosad, osim atopijskog dermatitisa, nije ozbiljnije bolovao. Obiteljska anamneza je uredna, uz negativan kontakt s bolesnikom koji boluje od aktivne tuberkuloze (TBC). Kod prijma je febrilan, tahikardan, blijed, uz obilni sekret u nosu. Ždrijelo je hiperemično, uz uredan auskultacijski nalaz nad plućima. Na radiogramu (rtg) pluća vidljiv je infiltrat u apikalnom segmentu srednjeg režnja desno. Rezultati laboratorijske obrade prikazani su u tablici 2. S obzirom na trajanje tegoba i rtg nalaz pluća obavljena je obrada u smjeru TBC-a: TST je bio negativan (4 mm), QFT-GIT-test neodrediv (zbog smanjene koncentracije IFN- γ nakon stimulacije s mitoge-

TABLICA 2. Rezultati laboratorijskih pretraga tijekom liječenja

| | Rezultati | | Referentne vrijednosti |
|-------------------------------|-----------|--------|------------------------|
| | Dan 1 | Dan 16 | |
| IFN- γ (kIU/L) | Neodrediv | <0,35 | \leq 0,35 |
| Mitogen (kIU/L) | 0,27 | 2,39 | \geq 0,5 |
| Nil* (kIU/L) | 0,08 | 0,06 | <8 |
| SE (mm) | 22 | 7 | 0-20 |
| CRP (mg/L) | 14,5 | 0,3 | 0-20 |
| Leukociti ($\times 10^9$ /L) | 16,3 | 8,9 | 6,0-16,0 |
| Limfociti (%) | 30 | 48 | 32-68 |
| IgE (kIU/L) | 204 | | <30,4 |

Nil* - negativna kontrola-bez stimulacije mitogenom i antigenima *M. tuberculosis*

nom PHA), gastrolavat na *M. tuberculosis* negativan. Kontrolni QFT-GIT-test učinjen nakon sanacije akutne upale bio je negativan, uz urednu pozitivnu i negativnu kontrolu.

RASPRAVA

Prikazani slučaj neodredivog rezultata QFT-GIT-testa u imunokompetentnog djeteta uputio je na to da je riječ o prolaznom neodredivom nalazu. Gledano iz perspektive prikazanog bolesnika, u kojeg je neodrediv rezultat QFT-GIT-testa posljedica snižene koncentracije IFN- γ nakon stimulacije mitogenom PHA, kao mogući uzroci nameću se: akutna upala, limfocitopenija, terapija penicilinskim antibiotikom i atopija. Budući da je ponovljeni QFT-GIT-test imao urednu koncentraciju IFN- γ u pozitivnoj kontroli, atopiju kao mogući uzrok u ovom slučaju možemo isključiti, a svaki od preostalih triju čimbenika mogao je biti uzrokom neodredivog rezultata. No nije isključena ni mogućnost njihova sinergističkog učinka.

Mitogen PHA, kao pozitivna kontrola, aktivator je limfocita T i s obzirom na trajanje inkubacije služi za procjenu sposobnosti efektorskih limfocita T da na adekvatan antigeni podražaj odgovore produkcijom IFN- γ . Ako je koncentracija IFN- γ nakon stimulacije s mitogenom PHA < 0,5 IU/mL nije moguće procijeniti status infekcije s *M. tuberculosisom*, jer se dobije neodrediv rezultat. Primjenom pozitivne kontrole procjenjuje se bolesnikov imunski sustav i ispravnost postupanja s uzorkom, da bi se mogućnost dobivanja lažno negativnih rezultata svela na najmanju moguću mjeru (7). Pritom se slijede pravila za uzorkovanje krvi, kako bi se izbjegle predanalitičke interferencije koje bi mogle utjecati na ishod analize. Mora se oduzeti točan volumen krvi tako da omjer krvi i heparina, mitogena odnosno antigena bude prema uputama proizvođača reagensa. Sestre koje uzorkuju krv za analizu posebno su educirane. Proizvođač je predvidio da se nakon uzimanja uzorka krv inkubira na 37°C

tijekom 18-24 sata, te da inkubaciju treba započeti unutar 16 sati od prikupljanja uzorka. *Herrera i sur.* su u svom istraživanju pokazali da odgađanje inkubacije od 12 sati nakon uzorkovanja dovodi do statistički značajno povećanog udjela neodredivih rezultata (46). Naime, kad je inkubacija provedena neposredno nakon uzimanja uzoraka krvi, nije dobiven niti jedan neodrediv rezultat, dok je u slučaju 12-satnog odgađanja inkubacije dobiveno 17,1% neodredivih rezultata QFT-GIT-testa. Svi neodredivi rezultati su bili posljedica smanjene koncentracije IFN- γ nakon stimulacije s mitogenom PHA, upućujući na mogućnost slabljenja funkcije limfocita T za vrijeme pohranjivanja uzoraka krvi na sobnoj temperaturi prije inkubacije na 37°C (46). Iako su rezultati ovog istraživanja pokazali da odgađanje inkubacije dovodi do povećanog udjela neodredivih rezultata QFT-GIT-testa, mali broj ispitanika upućuje na potrebu da navedeno treba potvrditi na većem uzorku, kako bi se u potpunosti evaluirao utjecaj odgađanja inkubacije na pojavnost neodredivih rezultata IGRA-testova. Ako se poštuju pravila dobre laboratorijske prakse, razlozi neodredivih rezultata su klinički.

Oštećenje imunskog sustava može biti posljedica smanjenog broja i/ili smanjene funkcije limfocita T, primjerice kod infekcije humanim imunodeficientnim virusom (HIV), kronične bubrežne bolesti, uznapredovale jetrene bolesti, malignih bolesti i kroničnih upalnih bolesti koje zahtijevaju primjenu imunosupresivne terapije (47). Neodrediv rezultat IGRA-testa može dati korisnu informaciju o funkcionalnom stanju limfocita T i uputiti na stanja povezana s imunosupresijom (46). Limfocitopenija posebno smanjen broj CD4+ limfocita T najčešći je laboratorijski nalaz koji se dovodi u vezu s povećanom učestalošću neodredivih rezultata QFT-GIT-testa (47). Naime, limfocitopenija je povezana sa smanjenom produkcijom IFN- γ , dovodeći do povećane mogućnosti nastanka neodredivog rezultata kao posljedica smanjene koncentracije IFN- γ nakon stimulacije s mitogenom PHA (48). Tome ide u prilog i prikazani bolesnik koji je u vrijeme prvog određivanja IFN- γ imao limfocitopeniju. Hipoproteinemija je drugi laboratorijski nalaz koji se često dovodio u vezu s većom učestalošću dobivanja neodredivih rezultata QFT-GIT-testa primarno kod osoba starijih od 80 godina (48). Najnovija istraživanja primjene QFT-GIT-testa u djece upućuju na to da se hipoproteinemija može dovesti u vezu s pojavom neodredivih rezultata i u dječjoj dobi (38). Neka su istraživanja upućivala na povećanu učestalost neodredivih rezultata u djece mlađe životne dobi (< 5 godina), navodeći da limfociti T u toj životnoj dobi produciraju manje IFN- γ nakon stimulacije antigenim agensom (2, 15, 18). Najnovija istraživanja, koja su uključivala veći broj djece < 5 godina, upućuju na to da limfociti djece te životne dobi mogu odgovoriti adekvatnom produkcijom IFN- γ nakon odgovarajućeg podražaja, što znači da se IGRA-test može upotrijebiti i u djece najmlađe životne dobi (4, 23, 28).

Recentna istraživanja su utvrdila povećanu učestalost neodredivih rezultata QFT-GIT-testa zbog smanjenog odgovora limfocita T na stimulaciju mitogenom PHA u osoba ženskog spola (47). Biološki mehanizam navedene opservacije nije jasan, a dovodi se u vezu s hormonsko-specifičnim razlikama među spolovima u imunom odgovoru na PHA (47).

Imunosupresivna terapija, kao glukokortikoidima i/ili inhibitorima čimbenika tumorske nekroze (eng. *tumor necrosis factor- α* , TNF- α), djeluje tako da direktno smanjuje produkciju proupalnih citokina (IFN- γ , TNF- γ i interleukin-1) iz limfocita T (25, 48). Zbog navedenoga djeca koja su pod imunosupresivnom terapijom imaju veću vjerojatnost dobivanja neodredivog rezultata IGRA-testa. Ovdje je važno naglasiti ulogu TNF- α u aktivaciji i sazrijevanju makrofaga koji su centralni u obrani od infekcije s *M. tuberculosis*, pa je moguće da se tijekom primjene anti-TNF- α terapije aktivira LTBI (50). Zbog toga je važno aktivno tražiti, dijagnosticirati i adekvatno liječiti LTBI u djece kandidata za anti-TNF- α terapiju.

Kod djece koja su pod terapijom penicilinskim antibiotikom potrebno je odgoditi određivanje IGRA-testa. Naime, poznato je da benzilpenicilin konjugira s IFN- γ , smanjujući njegovu aktivnost i na taj način otežavajući određivanje koncentracije IFN- γ , što dovodi do mogućnosti nastanka neodredivog rezultata zbog lošeg odgovora nakon stimulacije s mitogenom PHA (6). Smatrajući da bi i drugi penicilinski antibiotici mogli imati slično djelovanje, terapija fenoksimetilpenicilinom mogla bi biti uzrokom neodredivog rezultata u prikazanog bolesnika.

Kao jedan od dodatnih mogućih rizičnih čimbenika za dobivanje neodredivog rezultata IGRA-testa može biti i atopija (6). Naime, u usporedbi sa zdravim ispitanicima u atopičara je smanjen broj stanica koje stvaraju IFN- γ , što može dovesti do neodredivih rezultata, a nedostatan T_H1 imuni odgovor narušava nužnu ravnotežu između T_H1 i T_H2 imunoreakcije, pogodujući razvoju alergijskih bolesti. Budući da je prikazan bolesnik u ponovljenom određivanju IFN- γ imao uredan nalaz, atopija nije bila uzrokom neodredivog rezultata.

Aabye i sur. su prvi dokazali da pušači imaju smanjen odgovor IFN- γ nakon stimulacije limfocita T s antigenima specifičnim za *M. tuberculosis* i veću učestalost neodredivih rezultata IGRA-testa, upućujući na potrebu opreza prilikom interpretacije rezultata IGRA-testa u pušača (49). Navedeni učinak mogao bi biti posljedica od ranije poznatog negativnog djelovanja pojedinih komponenti cigaretnog dima na funkciju limfocita T, što u pušača dovodi do povećane incidencije infektivnih bolesti i smanjenog učinka cijepljenja. Budući da je nedavno objavljeno istraživanje provedeno na miševima također pokazalo da izloženost pasivnom pušenju dovodi do smanjenog odgovora IFN- γ nakon stimulacije limfocita T, oprez je potreban i kod interpretacije rezultata IGRA-testa u djece roditelja pušača (49).

Hipertermija može potaknuti sintezu IFN- γ , djelujući kao fiziološki adjuvans na T_H1 limfocite, uzrokujući povećanu koncentraciju IFN- γ u epruveti bez mitogena i bez antigena visoko specifičnih za *M. tuberculosis*, što može u febrilne djece biti uzrokom neodredivog rezultata IGRA-testa. Povišena koncentracija IFN- γ može se naći u raznim infektivnim bolestima (npr. tuberkuloza, parazitarne bolesti, pneumonija), autoimunskim bolestima (reumatoidni artritis, tiroiditis, sistemski eritemski lupus), kod prisutnih heterofilnih antitijela i/ili zbog povećane sekrecije IFN- γ nakon cijepljenja, pa su to sve stanja koja su povezana s povećanom učestalošću neodredivih rezultata zbog visoke koncentracije IFN- γ u negativnoj kontroli (46, 50).

Analiza istraživanja provedenih u dječjoj populaciji s QFT-GIT-testom (Tablica 1) pokazala je veći udio neodredivih rezultata u slučajevima kad se plazma nakon inkubacije smrzavala. Ako se iz analize isključe ta istraživanja, tada udio neodredivih rezultata iznosi 2,01% (190/9468). Prema uputama proizvođača, bude li se analiza radila u razdoblju od 8 tjedana nakon uzimanja uzorka, moguće je plazmu smrznuti na temperaturu ispod -20°C (preporučljivo na manje od -70°C) (7). No uočena razlika u postotku neodredivih rezultata zahtijeva daljnju analizu, kako bi se utvrdilo utječu li razlike u pohranjivanju plazme nakon inkubacije i odgađanje određivanja IFN- γ na povećanu pojavnost neodredivih rezultata.

Iz svega navedenog jasno je da neodrediv rezultat QFT-GIT-testa može imati mnogo veće značenje od same nemogućnosti određivanja statusa infekcije s *M. tuberculosisom*. Optimalni plan praćenja djeteta s neodredivim rezultatom IGRA-testa nije još utvrđen, no svi se slažu s mišljenjem da test treba ponoviti s novim uzorkom krvi. Nije utvrđeno u kojem vremenskom intervalu, moglo bi se preporučiti nakon sanacije akutne upale. Serijskim praćenjem osoba s neodredivim rezultatom IGRA-testa u vremenskom intervalu od jednog tjedna utvrđeno je da ih većina postaje negativna (47). U onih u kojih rezultati postanu pozitivni, potrebno je daljnjom obradom isključiti aktivni TBC, te nakon isključenja aktivne bolesti provesti kemoprofilaksu LTBI-a. Ako je i kontrolni nalaz neodrediv, potrebna je daljnja dijagnostička obrada da bi se utvrdio mogući uzrok, bilo smanjene koncentracije IFN- γ nakon stimulacije mitogenom PHA, bilo povećane koncentracije IFN- γ u negativnoj kontroli. Da bi se smanjio udio neodredivih rezultata i time nepotrebni troškovi, QFT-GIT-test je preporučljivo izvoditi nakon sanacije akutne upale uz obveznu standardizaciju predanalitičkih i analitičkih postupaka.

S obzirom na sve širu upotrebu IGRA-testova, nameće se sve veća potreba za smjernicama koje su temeljene na dokazima o optimalnom praćenju djece s neodredivim rezultatima IGRA-testa.

Skraćenice:

IGRA-testovi – testovi oslobađanja interferona gama
 LTBI – latentna tuberkulozna infekcija
 TST – tuberkulinski kožni test
 ESAT-6 – early secretory antigenic target-6-specific T cells
 CFP-10 – culture filtrate protein-10
 PHA – fitohemaglutinin
 TBC – tuberkuloza
 RTG – radiogram
 HIV – humani imunodeficijenti virus
 TNF- α – inhibitori čimbenika tumorske nekroze

NOVČANA POTPORA/FUNDING

Nema/None

ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL

Nije potrebno/None

DOPRINOSI AUTORA/DECLARATION OF AUTHORSHIP

Pavić I. – pretraživanje literature, izrada tablica, analiza i tumačenje podataka, pisanje rada/literature search, drawing tables, analysis and interpretation of data, writing paper

Tješić Drinković D., Čepin Bogović J., Dodig S. – analiza i tumačenje podataka, pisanje rada/analysis and interpretation of data, writing paper

SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST

Autori su popunili *the Unified Competing Interest form* na www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (dostupno na zahtjev) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju financijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati na objavljeni rad./All authors have completed the *Unified Competing Interest form* at www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

LITERATURA

1. WHO. Global tuberculosis report 2012. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf
2. Lighter J, Rigaud M, Eduardo R, Peng CH, Pollack H. Latent tuberculosis diagnosis in children by using the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test. *Pediatrics*. 2009;123:30-7. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2007-3618>
3. Baker CA, Thomas W, Stauffer WM, Peterson PK, Tsukayama DT. Serial testing of refugees for latent tuberculosis using the QuantiFERON-TB Gold In-Tube: effects of an antecedent tuberculin skin test. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80:628-33.
4. Pavić I. Dijagnostička vrijednost interefrona gama iz limfocita djece mlađe od pet godina s latentnom tuberkuloznom infekcijom. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb 2013; Disertacija.
5. Rose MV, Kimaro G, Kroidl I, et al. Evaluation of QuantiFERON microtube using 0.9 mL blood, for diagnosing tuberculosis infection. *Eur Respir J*. 2013;41:909-16. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00194311>
6. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arcmed.2011.02.001>

7. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/MedicalDevices/MedicalDevicesAdvisoryCommittee/MicrobiologyDevicesPanel/UCM260551.pdf>
8. Tsiouris SJ, Austin J, Toro P, et al. Results of a tuberculosis-specific IFN- γ assay in children at high risk for tuberculosis infection. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006;10:939-41.
9. Chun JK, Kim CK, Kim HS, et al. The role of whole blood interferon- γ assay for the detection of latent tuberculosis infection in Bacille Calmette-Guérin vaccinated children. *Mycrobiology.* 2008;62:389-94.
10. 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. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002624>
11. Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, Niemann S, Nienhaus A. Predictive value of a whole blood IFN- γ assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:1164-70. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200711-1613OC>
12. Domínguez J, Ruiz-Manzano J, De Souza-Galvão M, et al. Comparison of two commercially available gamma interferon blood tests for immunodiagnosis of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2008;15:168-71. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00364-07>
13. Mandalakas AM, Hesselring AC, Chegou NN, et al. High level of discordant IGRA results in HIV-infected adults and children. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12:417-23.
14. Petrucci R, Abu Amer N, Gurgel RQ, et al. Interferon gamma, interferon-gamma-induced-protein 10, and tuberculin responses of children at high risk of tuberculosis infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27:1073-7. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e31817d05a3>
15. Bergamini BM, Losi M, Vaienti F, et al. Performance of commercial blood tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection in children and adolescents. *Pediatrics.* 2009;123:419-24. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2008-1722>
16. Bianchi L, Galli L, Moriondo M, et al. Interferon-gamma release assay improves the diagnosis of tuberculosis in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28:510-4. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e31819abf6b>
17. 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.* 2008;135:1010-8. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.08-2048>
18. Kampmann B, Whittaker E, Williams A, et al. Interferon- γ release assay do not identify more children with active tuberculosis than the tuberculin skin test. *Eur Respir J.* 2009;33:1374-82. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00153408>
19. Lighter J, Rigaud M, Huie M, Peng CH, Pollack H. Chemokine IP-10: an adjunct marker for latent tuberculosis infection in children. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009;13:731-6.
20. Stavri HR, Murgoci G, Ulea I, Popa LG, Popa MI. Prospective comparison of two brands of tuberculin skin tests and Quantiferon-TB Gold in-tube assay performances for tuberculosis infection in hospitalized children. *J Clin Med.* 2010;5:271-6.
21. Altet-Gómez N, De Souza-Galvão M, Latorre I, et al. Diagnosing TB infection in children: analysis of discordances using in vitro tests and tuberculin skin test. *Eur Respir J.* 2011;37:1166-74. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00022710>
22. Borgia P, Cambieri A, Chini F, et al. Suspected transmission of tuberculosis in a maternity ward from a smear-positive nurse: preliminary results of clinical evaluations and testing of neonates potentially exposed, Rome, Italy, 1 January to 28 July 2011. *Euro Surveill* 2011;16(40):pii=19984. Available on-line: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19984>
23. Debord C, De Lauzanne A, Gourgouillon N, et al. Interferon-gamma release assay performance for diagnosing tuberculosis disease in 0- to 5-year-old children. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30:995-7. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e3182272277>
24. Kasambira TS, Shah M, Adrian PV, et al. QuantiFERON-TB Gold In-TUBE for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children with household tuberculosis contact. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15:628-34. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.10.0555>
25. Kwakernaak AJ, Houtman PM, Weel JFL, Spoorenberg JPL, Jansen TLTA. A comparison of an interferon-gamma release assay and tuberculin skin test in refractory inflammatory disease patients screened for latent tuberculosis prior to the initiation of a first tumor necrosis factor α inhibitor. *Clin Rheumatol.* 2011;30:505-10. <http://dx.doi.org/10.1007/s10067-010-1550-z>
26. Losi M, Bergamini BM, Venturelli C, et al. Tuberculosis infection in foreign-born children: a screening survey based on skin and blood testing. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15:1182-4. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.10.0736>
27. Nenadić N, Kristić Kirin B, Zoričić Letoja I, Plavec D, Zrinski Topić R, Dodig S. Serial interferon- γ release assay in children with latent tuberculosis infection and children with tuberculosis. *Pediatr Pulmonol.* 2011;47:401-8. <http://dx.doi.org/10.1002/ppul.21555>
28. Pavić I, Zrinski Topić R, Raos M, Aberle N, Dodig S. Interferon- γ release assay for the diagnosis of latent tuberculosis in children younger than 5 years of age. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30:866-70. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e318220c52a>
29. Shah M, Kasambira TS, Adrian PV, Madhi SA, Martinson NA, Dorman SE. Longitudinal analysis of QuantiFERON-TB Gold In-Tube in children with adult household tuberculosis contact in South Africa: a prospective cohort study. *PloS ONE* 2011;6:e26787. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0026787>
30. Thomas B, Pugalenth A, Patel H, Woltmann G, Bankart J, Hoskyns W. Concordance between tuberculin skin test and interferon- γ assay and interferon- γ response to mitogen in pediatric tuberculosis contacts. *Pediatr Pulmonol.* 2011;46:1225-32. <http://dx.doi.org/10.1002/ppul.21494>
31. Alsleben N, Ruhwald M, Rüssmann H, Marx FM, Wahn U, Magdorf K. Interferon-gamma inducible protein 10 as a biomarker for active tuberculosis and latent tuberculosis infection in children: a case-control study. *Scand J Infect Dis.* 2012;44:256-62. <http://dx.doi.org/10.3109/00365548.2011.632644>
32. Basu Roy R, Sotgiu G, Altet-Gómez N, et al. Identifying predictors of interferon- γ release assay results in pediatric latent tuberculosis: a protective role of *Bacillus Calmette-Guérin*? *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186:378-84. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201201-0026OC>
33. Kabeer BSA, Paramasivam P, Raja A. Interferon gamma and interferon gamma inducible protein-10 in detecting tuberculosis infection. *J Infect.* 2012;64:573-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2012.02.013>
34. Knappik M, Schönfeld N, Günther A, et al. Interferon-gamma release assays for hospital-based tuberculosis diagnostics in children and adolescents-a retrospective analysis. *Pneumologie.* 2012;66:207-11. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1308914>
35. Rutherford ME, Hill PC, Maharani W, et al. Risk factors for *Mycobacterium tuberculosis* infection in Indonesian children living with a sputum smear-positive case. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012;16:1594-9. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.12.0389>
36. Dogra S, Narang P, Mendiratta DK, et al. Comparison of a whole blood interferon- γ assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect.* 2007;54:267-76.
37. Thomas TA, Mondal D, Noor Z, et al. Malnutrition and helminth infection affect performance of an interferon gamma-release assay. *Pediatrics.* 2010;126:e1522-9.
38. Mahelai D. Comparison of tuberculin skin test and QuantiFERON TB Gold In-tube assay for the diagnosis of tuberculosis infection and disease in young children; study conducted as part of the development of a TB

- vaccine site in Southern India. The University of Bergen, Bergen 2011; Master thesis.
39. Moyo S, Isaacs F, Gelderbloem S, et al. Tuberculin skin test and QuantiFERON assay in young children investigated for tuberculosis in South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15:1176-81. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.10.0770>
 40. Cristelis E, Amanitadou V, Syridou G, et al. The effect of age on whole blood interferon-gamma release assay response among children investigated for latent tuberculosis infection. *J Pediatr.* 2012;161:632-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.04.007>
 41. Onur H, Hatipoğlu S, Arica V, Hatipoğlu N, Arica SG. Comparison of Quantiferon test with tuberculin skin test for the detection of tuberculosis infection in children. *Inflammation.* 2012;35:1518-24. <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-012-9466-1>
 42. Tuuminen T, Salo E, Kotilainen H, Ruhwald M. Evaluation of the filter paper IP-10 tests in school children after exposure to tuberculosis: a prospective cohort study with a 4-year follow-up. *BMJ Open.* 2012;2:e001751. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2012-001751>
 43. Yassin MA, Petrucci R, Garie KT, et al. Use of tuberculin skin test, IFN- γ release assay and IFN- γ -induced protein IP-10 to identify children with TB infection. *Eur Respir J.* 2013;41:644-8. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00012212>
 44. Wassie L, Aseffa A, Abebe M, et al. Parasitic infection may be associated with discordant responses to QuantiFERON and tuberculin skin test in apparently healthy children and adolescents in a tuberculosis endemic setting, Ethiopia. *BMC Infect Dis.* 2013;13:265. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-13-265>
 45. Herrera V, Yeh E, Murphy K, Parsonnet J, Banaci N. Immediate incubation reduces results for QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2672-6. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00482-10>
 46. Banach DB, Harris TG. Indeterminate QuantiFERON-TB Gold results in a public health clinic setting. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15:1623-9. <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.11.0017>
 47. 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. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00075008>
 48. Aabye MG, Hermansen TS, Ruhwald M, et al. Negative effect of smoking on the performance of the QuantiFERON TB Gold in tube test. *BMC Infect Dis.* 2012;12:379. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-12-379>
 49. Pavić I, Čepin Bogović J. Test oslobađanja interferona gama u dijagnostici latentne tuberkulozne infekcije u djece. U: Pavlov N, Čulić S, Miše K, urednici. *Prevenција i liječenje infekcija dišnog sustava.* 1. izd. Split; KBC Split: 2013:301-9.

SUMMARY

Indeterminate result of interferon-gamma release assay in a child: review of literature with illustrative case

Ivan Pavić, Dorian Tješić Drinković, Jasna Čepin Bogović, Slavica Dodig

Interferon-gamma release assays (IGRAs) have offered significant progress in the detection of M. tuberculosis infection. In addition to obtaining negative or positive results of IGRAs, there is a possibility of getting indeterminate results. An indeterminate test result indicates situations where it is not possible to determine the state of M. tuberculosis infection. Interpretation and accurate follow-up of children with indeterminate test results pose diagnostic challenges for clinicians. The aim of the present review is to show an illustrative case of a 15-month-old boy with indeterminate result of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test (QFT-GIT, Cellestis Ltd., Carnegie, Australia) during pneumonia, to point out the problems associated with getting indeterminate results. Follow-up test result after recovery was negative. QFT-GIT should preferably be performed upon resolution of acute inflammation with standardization of preanalytical and analytical factors in order to avoid indeterminate results. Furthermore, evidence-based guidelines on the optimal follow-up of children with indeterminate results will be important as IGRAs use becomes increasingly widespread.

Keywords: interferon-gama release tests; *Mycobacterium tuberculosis*; infant