



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

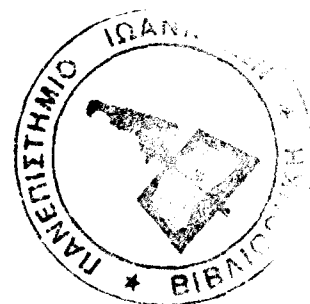
**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ  
ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΕΛΕΓΧΟΣ ΛΑΝΘΑΝΟΥΣΑΣ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ  
ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ ΦΥΜΑΤΙΝΟΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ  
ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗΣ- $\gamma$  ΣΕ  
ΠΑΘΟΥΣΜΙΑΚΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΜΕ ΑΥΞΗΜΕΝΟ ΚΙΝΔΥΝΟ  
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΒC**

**ΝΙΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ-ΜΕΛΙΤΑ  
ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2012**



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (Νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

**Ημερομηνία αίτησης της κ. Νικολοπούλου Μελίτας-Μαρίας: 13-11-2007**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 623<sup>α</sup>/18-12-2007**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Κωνσταντόπουλος Σταύρος, Καθηγητής Παθολογίας-Πνευμονολογίας

Μέλη

Μαυρίδης Ανέστης, Καθηγητής Μικροβιολογίας

Δασκαλόπουλος Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Πνευμονολογίας

**Ημερομηνία ορισμού Θέματος: 9-1-2008**

*«Έλεγχος λανθάνουσας φυματίωσης με την ταυτόχρονη διενέργεια φυματινοαντίδρασης και δοκιμασίας προσδιορισμού ιντερφερόνης-γ σε πληθυσμιακές ομάδες με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης TBC»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 726<sup>α</sup>/17-1-2012**

1. Ευαγγέλου Άγγελος, Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Κωνσταντόπουλος Σταύρος, Ομότιμος Καθηγητής Παθολογίας-Πνευμονολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Μαυρίδης Ανέστης, τ. Καθηγητής Μικροβιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Δαλαβιάγκα Παναγιώτα-Άννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Δασκαλόπουλος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Πνευμονολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Λεβειδίωτου - Στεφάνου Σταματίνα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Κωνσταντινίδης Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής Πνευμονολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων

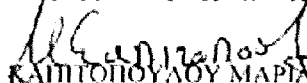
**Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 26-3-2012**

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

Τσαφλίδου Μαργαρίτα

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής

Η Γραμματέας της Σχολής

  
ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ

Στην οικογένεια μου

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σύμφωνα με τις πρόσφατες έρευνες η φυματίωση αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως, μεταξύ των λοιμογόνων νόσων, μετά τον ιό του AIDS/ HIV. Υπολογίζεται ότι 1.6 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν από φυματίωση το 2005.

Στις αναφορές επιπολασμού σημειώνεται ότι περίπου το 1/3 της ανθρωπότητας έχει μολυνθεί από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Στις περιοχές με υψηλούς ρυθμούς μετάδοσης οι νέοι ενήλικες εμφανίζουν την υψηλότερη επίπτωση της νόσου, ενώ όσο ο ρυθμός μετάδοσης μειώνεται, κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες, η πλειοψηφία των περιπτώσεων φυματίωσης είναι οι ηλικιωμένοι. Προεξάρχοντα ρόλο στην αναζωπύρωση ή στη βραδεία πτώση της επίπτωσης της φυματίωσης έχουν παίξει η εξάπλωση του HIV/AIDS, η επιδείνωση της κοινωνικής και οικονομικής κατάστασης σε ορισμένες χώρες, η μετανάστευση και η γήρανση του πληθυσμού.

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με τα νεότερα στοιχεία του ΚΕΕΛΠΙΝΟ (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων) παρατηρείται πτωτική τάση του δηλωθέντος αριθμού κρουσμάτων από το έτος 1998 (1103 κρούσματα) έως τον Μάιο 2008, αν και είναι δύσκολο να καταδειχθεί ο ακριβής αριθμός κρουσμάτων λόγω της ανεπαρκούς καταγραφής τους. Σύμφωνα όμως με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας υπολογίζονται περίπου 19 νέα κρούσματα φυματίωσης ανά 100000 πληθυσμό ανά έτος στην Ελλάδα, ποσοστό από τα υψηλότερα στη Δυτική Ευρώπη. Τα περισσότερα κρούσματα φυματίωσης εμφανίζονται σε ηλικίες > 65 ετών, ενώ αύξηση του αριθμού των κρουσμάτων παρατηρείται και στην ηλικιακή ομάδα 25-44 ετών.

Ο μεγάλος αριθμός ατόμων με λανθάνουσα φυματίωση αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στην εξάλειψη της φυματίωσης. Η έγκαιρη διάγνωση και συνεπώς η αποτελεσματική θεραπεία των ατόμων με λανθάνουσα φυματίωση, λαμβάνοντας υπόψη τις κοινωνικές και οικονομικές επιπτώσεις, καθώς και τις παρενέργειες της θεραπείας, κρίνεται απαραίτητη για να ελαττωθεί σημαντικά η εξέλιξη της λανθάνουσας φυματίωσης σε ενεργό νόσο.

Τον τελευταίο αιώνα και μέχρι πρόσφατα η φυματινοαντίδραση Mantoux αποτελούσε τη μοναδική μέθοδο αξιολόγησης της μόλυνσης από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Η παραπάνω μέθοδος εμφανίζει ορισμένα μειονεκτήματα, όπως την ανάγκη για παραπάνω από μια επισκέψεις για την ολοκλήρωση της εξέτασης, υποκειμενικές μετρήσεις, τη πιθανότητα εμφάνισης φαινομένου «ενίσχυσης» (boosting effect) με την εφαρμογή επαναληπτικών δερματικών δοκιμασιών φυματίνης. Τα σπουδαιότερο όμως

μειονέκτημα είναι η εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων εξαιτίας λοίμωξης από άτυπα μυκοβακτηρίδια ή μετά από αντιφυματικό εμβολιασμό (BCG), το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την εφαρμογή περιττής θεραπείας.

Τα τελευταία χρόνια, για την αντιμετώπιση των παραπάνω μειονεκτημάτων, αναπτύχθηκαν νέες *in vitro* τεχνικές, οι οποίες ονομάζονται «δοκιμασίες απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$ » ή *interferon- $\gamma$  release assays (IGRAs)*. Οι τεχνικές αυτές υπολογίζουν την ιντερφερόνη- $\gamma$  που απελευθερώνεται από τα διεγερμένα, μετά από επαφή με ειδικά για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης αντιγόνα, T λεμφοκύτταρα. Τα τελευταία χρόνια δυο είδη μεθόδων IGRA είναι εμπορικά διαθέσιμες. Η πρώτη μέθοδος ονομάζεται QuantiFERON –TB Gold assay και η δεύτερη ονομάζεται T-SPOT. TB.

Ένα σημαντικό όπλο κατά της φυματίωσης σε πολλές χώρες του κόσμου αποτελεί ο εμβολιασμός με BCG. Στην Ελλάδα ο εμβολιασμός με BCG είναι υποχρεωτικός με νομοθεσία του 1960, ενώ από το 1988 πραγματοποιείται όταν το παιδί γίνει 6 ετών ή αμέσως μετά τη γέννησή του σε περίπτωση διαβίωσης σε περιβάλλον με αυξημένο κίνδυνο.

Λαμβάνοντας υπόψη, τον υψηλό αριθμό νέων κρουσμάτων στην Ελλάδα, καθώς και το γεγονός ότι οι νεοσύλλεκτοι στρατιώτες, εξαιτίας των συνθηκών διαβίωσης, αποτελούν μια εν δυνάμει μεγάλη «δεξαμενή» ανάπτυξης ενεργού νόσου κρίνεται σημαντικός ο καθορισμός της επίδρασης του εμβολιασμού με BCG στην ανάγνωση της φυματινοαντίδρασης Mantoux.

Μια μεγάλη πρόκληση είναι η διάγνωση και η έγκαιρη θεραπεία της φυματίωσης στους ηλικιωμένους που αποτελούν τη μεγαλύτερη «δεξαμενή» λανθάνουσας φυματίωσης και βρίσκονται σε μεγάλο κίνδυνο για επανενεργοποίηση της νόσου, λόγω της εξασθένησης της κυτταρικής ανοσίας, των υποκείμενων οξέων ή χρόνιων νοσημάτων και της κακής διατροφής. Η πρόκληση έγκειται στην πιθανότητα εμφάνισης ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων σε άτομα πολύ μεγάλης ηλικίας με την έως τώρα μοναδική μέθοδο αξιολόγησης της μόλυνσης από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης, τη μέθοδο Mantoux.

Σκοπός της παρούσας μελέτης, που διεξήχθη σε δύο φάσεις, ήταν η σύγκριση της αποτελεσματικότητας των τεχνικών «απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$ », συγκεκριμένα του QuantiFERON TB Gold in tube, και της δερμοαντίδρασης Mantoux σε νεοσύλλεκτους άρρνες του Ελληνικού Στρατού, οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με BCG στην παιδική τους ηλικία και οι οποίοι δεν είχαν εκτεθεί σε ενεργό φυματίωση (Φάση Α) καθώς και ο

προσδιορισμός της πρόσθετης αξίας του QuantiFERON TB Gold in tube σε σχέση με την τεχνική Mantoux στην ανίχνευση της λανθάνουσας φυματίωσης στους ηλικιωμένους, και συγκεκριμένα στους ενοίκους ενός οίκου ευγηρίας, οι οποίοι ήρθαν σε άμεση επαφή με άτομο με ενεργό φυματίωση (Φάση Β).

Η διατριβή διαιρείται σε δυο μέρη, το Γενικό και το Ειδικό μέρος. Στο πρώτο κεφάλαιο του Γενικού μέρους παραθέτονται στοιχεία σχετικά με τη φυματίωση και συγκεκριμένα τα ακόλουθα: ορισμός, επιδημιολογία, διάγνωση, διαφορική διάγνωση, παράγοντες κινδύνου, παθογένεια, παθολογική ανατομική, ταξινόμηση της φυματίωσης, κλινική εικόνα και θεραπευτική αντιμετώπιση. Στο δεύτερο κεφάλαιο του Γενικού μέρους αναπτύσσονται στοιχεία σχετικά με τη λανθάνουσα φυματίωση και συγκεκριμένα γίνεται αναφορά στον ορισμό, στην κλινική αξιολόγηση των εργαστηριακών εξετάσεων, στη θεραπεία και στην ανοσοποίηση με BCG. Στο τρίτο κεφάλαιο του Γενικού μέρους αναλύονται οι τεχνικές απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ και συγκεκριμένα τα είδη και τα πρωτόκολλά τους, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων και η ευαισθησία και η ειδικότητα των τεχνικών, το φαινόμενο της «ενίσχυσης», η επίδραση της αντιφυματικής θεραπείας στα αποτελέσματα των δοκιμασιών απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ, η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών, η εφαρμογή τους σε περιπτώσεις πνευμονικής και εξωπνευμονικής φυματίωσης και τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των IGRA σε σχέση με τη φυματινοαντίδραση Mantoux.

Στο Ειδικό μέρος περιγράφεται το πειραματικό πρωτόκολλο με τα χαρακτηριστικά των υπο μελέτη πληθυσμών και τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν. Ακολούθως αναλύονται τα αποτελέσματα και στη συνέχεια πραγματοποιείται κριτική συζήτηση πάνω σε αυτά. Τέλος παρουσιάζονται η περίληψη και η βιβλιογραφία που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον ομότιμο καθηγητή Πνευμονολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κωνσταντόπουλο Σταύρο για την υπομονή του, τις επικοδομητικές διορθώσεις και τις συμβουλές του καθ'όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής κυρίως: α) Δασκαλόπουλο Γεώργιο, Αναπληρωτή Καθηγητή Πνευμονολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και β) Μαυρίδη Ανέστη, τ. Καθηγητή Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη συμπαράσταση και τις συμβουλές τους μέχρι την ολοκλήρωση της διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ τη γραμματέα του Τομέα Πνευμονολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Πρεβεζιάνου Ελένη για την πολύτιμη βοήθεια της κατά τη διάρκεια της συγγραφής της παρούσας εργασίας.

Μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής δημοσιεύτηκε σε τεύχη των περιοδικών International Journal Tuberculosis Lung Diseases το έτος 2010 και Journal of American Geriatrics Society το έτος 2011.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

### ΠΡΟΛΟΓΟΣ

#### A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ.....	7
1.1 Ορισμός – Ο οργανισμός.....	7
1.2 Επιδημιολογία .....	9
1.3 Διάγνωση- Διαφορική διάγνωση.....	11
1.4 Παράγοντες κινδύνου .....	18
1.5 Παθογένεια .....	24
1.6 Παθολογική ανατομική .....	27
1.7 Ταξινόμηση φυματίωσης .....	29
1.8 Κλινική εικόνα .....	30
1.9 Θεραπευτική αντιμετώπιση.....	36
Α) Φαρμακευτική .....	36
Β) Χειρουργική .....	48
2. ΛΑΝΘΑΝΟΥΣΑ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ .....	49
2.1 Ορισμός .....	49
2.2 Κλινική ερμηνεία εργαστηριακών εξετάσεων .....	49
2.3 Θεραπεία λανθάνουσας φυματικής λοίμωξης.....	54
2.4 Ανοσοποίηση με BCG.....	55
3. ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗΣ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗΣ-γ (INTERFERON- γ RELEASE ASSAYS) .....	61
3.1 Είδη τεχνικών .....	61
3.2 Πρωτόκολλα τεχνικών .....	63
α) Πρωτόκολλο τεχνικής QuantiFERON-TB Gold in tube assay.....	63
β) Πρωτόκολλο τεχνικής QuantiFERON-TB Gold assay.....	65
γ) Πρωτόκολλο τεχνικής T-SPOT.TB8 .....	67
δ) Πρωτόκολλο τεχνικής T-SPOT.TB 96 .....	69
3.3 Ερμηνεία αποτελεσμάτων μεθόδων IGRA .....	69

3.4	Ευαισθησία και ειδικότητα μεθόδων IGRA.....	72
3.5	Φαινόμενο ενίσχυσης (boosting effect).....	81
3.6	Η επίπτωση της αντιφυματικής θεραπείας στα αποτελέσματα των δοκιμασιών απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ.....	83
3.7	Επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ.....	85
3.8	Εφαρμογή των δοκιμασιών απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ σε περιπτώσεις πνευμονικής και εξωπνευμονικής φυματίωσης.....	86
3.8.1	Εφαρμογή των IGRA στο πλευριτικό Υγρό.....	86
3.8.2	Εφαρμογή των IGRA στο βρογχοκυελιδικό έκπλυμα (BAL).....	88
3.8.3	Εφαρμογή των IGRA στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό.....	90
3.8.4	Εφαρμογή των IGRA στο περικαρδιακό υγρό.....	91
3.8.5	Εφαρμογή των IGRA στο περιτοναϊκό υγρό.....	91
3.9	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των IGRA σε σχέση με την TST.....	92
3.10	Ανακεφαλαίωση.....	93

## **Β.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **Α΄ ΦΑΣΗ**

1.	Σκοπός.....	97
2.	Υλικό- μέθοδος.....	98
3.	Αποτελέσματα.....	101
4.	Συζήτηση.....	105

### **Β΄ ΦΑΣΗ**

1.	Σκοπός.....	113
2.	Υλικό-μέθοδος.....	114
3.	Αποτελέσματα.....	117
4.	Συζήτηση.....	121
5.	Περίληψη.....	126
6.	Summary.....	131

7. Βιβλιογραφία.....	135
7.1 Βιβλιογραφία γενικού μέρους.....	135
7.2 Βιβλιογραφία ειδικού μέρους.....	163

## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1. ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ

### 1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ- Ο ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ

Η νόσος, γνωστή ως φυματίωση, θεωρείται η αντίδραση των ιστών του ανθρώπινου οργανισμού στην παρουσία και στον πολλαπλασιασμό των μυκοβακτηριδίων της φυματίωσης ανθρώπινου ή βοείου ή αφρικάνικου τύπου.

Το ερώτημα, αν η φυματίωση ήταν μεταδιδόμενη νόσος ή οφειλόταν σε κληρονομική προδιάθεση αποτελούσε αντικείμενο έρευνας τον 19<sup>ο</sup> αιώνα. Η απάντηση δόθηκε το 1882 όταν ο Robert Koch παρουσίασε τις σχολαστικές εργασίες του, στις οποίες είχε όχι μόνο απομονώσει τον αιτιολογικό παράγοντα αλλά είχε αποδείξει και την αιτιολογική σχέση του με τη φυματίωση. Ο Koch ονόμασε τον παράγοντα *tuberkelbazillus* (βάκιλος της φυματίωσης), αλλά αργότερα ο βάκιλος της φυματίωσης και ο βάκιλος της λέπρας συγκαταλέγονται στο γένος *Mycobacterium*. Στο σύμπλεγμα *mycobacterium tuberculosis* ανήκουν επτά είδη τα οποία παρουσιάζουν λιγότερο από 0.1% διαφορά σε γονιδιακό επίπεδο αλλά διαφέρουν ως προς τους ξενιστές τους και ως προς την επιδημιολογική τους συμπεριφορά (Πίνακας 1).

Πίνακας 1 Μέλη του συμπλέγματος *Mycobacterium tuberculosis*

Είδη	Κύριος ξενιστής	Άνθρωπος ως δευτερεύων ξενιστής
<i>M. tuberculosis</i>	άνθρωπος	[-]
<i>M. bovis</i>	αγελάδα, ελάφι, ασβός, βίσωνας	ναι
<i>M. caprae</i>	κατσίκα	ναι
<i>M. africanum</i>	άνθρωπος	[-]
<i>M. microti</i>	αρουραίος, λάμα	πολύ σπάνια
<i>M. canettii</i>	άνθρωπος	[-]
<i>M. pinnipedii</i>	φώκια	πολύ σπάνια

(Πίνακας από: PDO Davies, PF Barnes, SB Gordon. *Clinical tuberculosis*, Fourth Edition 2008)

Το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης θεωρείται θετικό κατά Gram μικρόβιο, αν και δύσκολα χρωματίζεται με αυτή τη χρώση. Όμως διαθέτει μια σχεδόν μοναδική ιδιότητα, η οποία ονομάζεται "οξεοαντοχή" (acid-fastness), η οποία βασίζεται στην ικανότητα του να διατηρεί το κόκκινο χρώμα, το οποίο αποκτά με χρώση με carbol fuschin ή σχετική arylmethane βαφή, μετά την προσθήκη διαλυμάτων οξέων ή αλκοόλης. Για αυτό το λόγο ονομάζεται οξεάντοχο ή αλκοολάντοχο βακτηρίδιο. Η σύγχρονη και ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μέθοδος οξεάντοχης βαφής ονομάζεται τεχνική Ziehl-Neelsen. Με αυτή τη τεχνική το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης φαίνεται ως ευθεία ή ελαφρώς κεκαμμένη κόκκινη βακτηρία, μήκους 14 μm και διαμέτρου 0.2- 0.6 μm.

Το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης μπορεί επίσης να χρωσθεί με φθορίζουσες ουσίες όπως η ουραμίνη και η ροδαμίνη αποκτώντας μια έντονα φθορίζουσα εμφάνιση.

Ο βάκιλος του Koch είναι αερόβιο μικρόβιο με απλές διατροφικές απαιτήσεις. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο τεχνητό θρεπτικό υλικό είναι το Löwenstein- Jensen, το οποίο περιέχει γλυκερόλη, μεταλλικά άλατα και ωά. Επίσης περιέχει πράσινο του μαλαχίτη, το οποίο βοηθάει στην απεικόνιση των αναπτυσσόμενων αποικιών, οι οποίες έχουν μουντό κίτρινο, υπόλευκο ή κρεμοειδές χρώμα. Οι καλύτερες συνθήκες ανάπτυξης στις καλλιέργειες είναι θερμοκρασία 33-39 °C, pH 6.5-6.8 και ατμόσφαιρα 5- 10 % CO<sub>2</sub>. Οι αποικίες του μυκοβακτηριδίου στο θρεπτικό μέσο Löwenstein- Jensen γίνονται ορατές μετά από περίπου 2-6 εβδομάδες έχοντας ανώμαλη επιφάνεια και μοιάζοντας με κουνουπίδι ή ψίχουλα ψωμιού.

Το ξεχωριστό χαρακτηριστικό του γένους Mycobacterium, το οποίο είναι υπεύθυνο για την οξεοαντοχή και άλλες μοναδικές ιδιότητές του, είναι το κυτταρικό του τοίχωμα. Η δομή του κυτταρικού τοιχώματος αποτελείται από μια εσωτερική στοιβάδα από πεπτιδογλυκάνη, η οποία συμβάλλει στο σχήμα και στη σταθερότητα των βακτηριακών κυττάρων[1]. Εξωτερικά της πεπτιδογλυκάνης υπάρχει ένα δικτυωτό μακρομόριο αποτελούμενο από αραβινόζη και γαλακτόζη. Εξωτερικά από το μακρομόριο αυτό υπάρχει ένα πυκνό «οχύρωμα» από μυκολικά οξέα, το οποίο είναι υπεύθυνο για το πάχος του τοιχώματος και την οξεοαντοχή [2]. Εξωτερικά αναπτύσσεται ένα στρώμα από dimycolates τρεχαλόζης και θειολιπίδια, τα οποία παίζουν ρόλο στην χαρακτηριστική ελικοειδή διάταξη των μυκοβακτηριδιακών κυττάρων στις μικροαποικίες αλλά και στην μολυσματικότητα τους [3]. Το Λιποαραβινομαμμαν (Lipoarabinomannan) αποτελεί ένα ακόμη διακλαδόμενο πολυσακχαρίδιο του κυτταρικού τοιχώματος, το οποίο κατέχει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή [4]. Τέλος,

περίπλοκα μόρια, τα οποία ονομάζονται μυκοσίδια (mycosides) είναι τοποθετημένα στην εξωτερική επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος παίζοντας το ρόλο των υποδοχέων των βακτηριοφάγων. Ο σίδηρος αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για την ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων. Η χήλωση, η μεταφορά του και η αποθήκευση του επιτυγχάνεται με τις μυκοβακτίνες (mycobactins), που αποτελούν ομάδα τοιχωματικών λιπιδίων [5].

## 1.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Σύμφωνα με τις πρόσφατες έρευνες και αναφορές επιπολασμού περίπου το 1/3 της ανθρωπότητας έχει μολυνθεί από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Υπολογίζεται ότι 8.8 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις φυματίωσης εμφανίστηκαν το 2005 και από αυτές τα 3.9 εκατομμύρια παρουσίαζαν θετικό άμεσο παρασκεύασμα πτυέλων, τη πιο μολυσματική μορφή της νόσου [6]. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) η μεγαλύτερη ετήσια επίπτωση το 2005 εμφανίστηκε στην Υποσαχάρια Αφρική, η οποία μαζί με τις χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης εμφάνισαν τη μεγαλύτερη αύξηση σε φορτίο νέων περιστατικών στη δεκαετία του 1990. Οι αναπτυσσόμενες χώρες εμφανίζουν συνεχώς μειούμενα σε αριθμό περιστατικά κάθε χρόνο, αν και παρατηρείται αύξηση στην ομάδα των μεταναστών [7]. Η φυματίωση αποτελεί νόσημα κυρίως των ενήλικων, καθώς παιδιά ηλικίας 0- 14 ετών αποτελούν μόνο το 10% των περιστατικών. Στις περιοχές με υψηλούς ρυθμούς μετάδοσης, όπως Περού, Αιτή, Βολιβία, νέοι ενήλικες εμφανίζουν την υψηλότερη επίπτωση της νόσου, ενώ όσο ο ρυθμός μετάδοσης πέφτει, κυρίως στις αναπτυσσόμενες χώρες, η πλειοψηφία των αυτόχθονων περιστατικών φυματίωσης είναι ηλικιωμένοι. Σύμφωνα με τις έρευνες το άρρεν φύλο φέρει το μεγαλύτερο μέρος του παγκόσμιου φορτίου της φυματίωσης [8].

Η φυματίωση αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως, μεταξύ των λοιμογόνων νόσων, μετά τον ιό του AIDS/ HIV. Υπολογίζεται ότι 1.6 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν από φυματίωση το 2005 [9]. Αν και είναι αδύνατον να υπολογιστεί ακριβώς η παγκόσμια τάση θανάτων από φυματίωση, εξαιτίας της ανεπαρκούς καταγραφής σε ορισμένες χώρες κυρίως στην Αφρική και στην Ασία, υπολογίζεται ότι αν και το ποσοστό θανάτων από φυματίωση αυξανόταν στη δεκαετία του 1990 η κορύφωση επήλθε πριν το έτος 2000. Είναι σημαντικό το γεγονός ότι περίπου τα 2/3 των ατόμων που δεν λαμβάνουν θεραπεία και εμφανίζουν θετικό άμεσο παρασκεύασμα θα πεθάνουν μέσα

στα επόμενα 5-8 χρόνια από την έναρξη της νόσου, ενώ το ποσοστό μειώνεται στο 10-15% μεταξύ ατόμων με αρνητικό άμεσο παρασκεύασμα [10,11].

Στην Ελλάδα ο επιπολασμός της φυματίωσης, δηλαδή το σύνολο των περιπτώσεων φυματίωσης ανά 100.000 πληθυσμού στον παρόντα χρόνο, είναι δύσκολο να καταδειχθεί λόγω της ανεπαρκούς καταγραφής των κρουσμάτων. Σύμφωνα με τα νεότερα στοιχεία του ΚΕΕΛΠΙΝΟ (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων) παρατηρείται πτωτική τάση του δηλωθέντος αριθμού κρουσμάτων από το έτος 1998 (1103 κρούσματα) έως τον Μάιο 2008 (245 κρούσματα). Όσον αφορά στο φύλο παρατηρείται μεγαλύτερος αριθμός κρουσμάτων στους άνδρες ως προς τις γυναίκες σε αναλογία κατά μέσο όρο 2.5/1. Τα περισσότερα κρούσματα εμφανίζονται σε ηλικίες > 65 ετών (πιθανόν λόγω της ύπαρξης εντός των ηλικιωμένων ατόμων «ζώντων» μυκοβακτηριδίων φυματίωσης από παλαιότερες μολύνσεις), ενώ μεγάλο αριθμό κρουσμάτων εμφανίζει η ηλικιακή ομάδα 25-44 ετών (Πίνακες 2, 3). Οι δείκτες νοσηρότητας στην Ελλάδα εμφανίζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων περιοχών, με μεγαλύτερη επίπτωση της νόσου στη Θράκη και στη Μακεδονία.

Πίνακας 2. Αριθμός κρουσμάτων νοσημάτων υποχρεωτικής δήλωσης. Σύνολο χώρας, έτη δήλωσης 1998-2008 (έως και Μάιο 2008)

ΕΤΟΣ/ΝΟΣΗΜΑ	ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ
1998	1103
1999	952
2000	703
2001	617
2002	581
2003	621
2004	776
2005	770
2006	686
2007	658
2008	245
ΣΥΝΟΛΟ	7712



Πίνακας 3 Αριθμός κρουσμάτων νοσημάτων υποχρεωτικής δήλωσης κατά ηλικία. Σύνολο χώρας, έτη δήλωσης 1998-2008 (έως και Μάιο 2008)

Ηλικία/έτη	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
0-4	55	14	7	12	11	6	13	10	13	15	11
5-14	65	21	17	33	32	9	19	31	31	24	14
15-24	97	83	41	47	33	44	31	47	58	60	20
25-44	268	254	155	168	177	165	142	155	185	166	70
45-64	205	220	137	124	120	128	123	115	173	147	61
65+	293	283	259	217	152	207	161	170	203	183	68
άγνωστη	120	77	87	16	16	62	287	242	23	63	1

Οι παράγοντες κινδύνου που μπορούν να παίξουν ρόλο στη διαμόρφωση της επιδημιολογίας της φυματίωσης είναι πολλοί. Άτομα του ιατρικού επαγγέλματος σε επαφή με ασθενείς που νοσούν από φυματίωση και άστεγοι εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο μόλυνσης. Ο διαβήτης, η λοίμωξη από HIV, η πυριτίαση, η ασιτία και ο καπνός αποτελούν επιπρόσθετους παράγοντες κινδύνου. Μελέτες που έχουν γίνει κατέδειξαν ότι ανάμεσα στα γονίδια που σχετίζονται με ευπάθεια στη φυματίωση είναι αυτά που κωδικοποιούν του υποδοχέα βιταμίνης D, την πρωτεΐνη των μακροφάγων την σχετιζόμενη με φυσική αντίσταση (natural resistance-associated macrophage protein), HLA, και την mannose binding lectin (MBL)[ 12-17].

Προεξάρχοντα ρόλο στην αναγέννηση ή στη βραδεία πτώση της νόσου της φυματίωσης έχουν παίξει η εξάπλωση του HIV/AIDS, η κοινωνική και οικονομική επιδείνωση της κατάστασης στις χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης, η μετανάστευση και η γήρανση του πληθυσμού.

### 1.3 ΔΙΑΓΝΩΣΗ – ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση της φυματίωσης αποτελεί σημαντικότατο αν και παραγνωρισμένο βήμα για τον έλεγχο της παγκόσμιας επιδημίας της φυματίωσης. Η διάγνωση ξεκινά με την κλινική υποψία. Τα κλασσικά συμπτώματα είναι ο βήχας, ο πυρετός και η απώλεια βάρους. Στη διαφορική διάγνωση πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη και τη φυματίωση σε κάθε

ασθενή με τα παραπάνω συμπτώματα, ιδιαίτερα αν ενυπάρχουν ορισμένα δημογραφικά χαρακτηριστικά όπως πρόσφατη διαβίωση σε χώρα με υψηλό επιπολασμό, πρόσφατη επαφή με άτομο που νοσεί, διαμονή σε φυλακή, άσυλο αστέγων, νοσοκομείο, η ταυτόχρονη νόσηση από HIV καθώς και η χρήση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων κυρίως ανταγωνιστών του TNF [18].

Το επόμενο βήμα στο διαγνωστικό αλγόριθμο αποτελεί η ακτινογραφία θώρακος. Λόγω του αυξανόμενου αριθμού των ατόμων με ταυτόχρονη προσβολή με φυματίωση και AIDS (νόσος επίκτητης ανοσοανεπάρκειας) είναι σημαντική και η γνώση των ακτινολογικών ευρημάτων σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα που χαρακτηρίζεται από πυλαία ή μεσοθωρακική λεμφαδενοπάθεια χωρίς να συνυπάρχουν απαραίτητα παρεγχυματικές βλάβες [19,20].

Τη βάση για τη διαγνωστική αξιολόγηση της φυματίωσης αποτελεί η εξέταση των πτυέλων. Τα πτύελα που λαμβάνονται με απόχρεμψη σε τρεις διαδοχικές ημέρες στέλνονται για άμεσο παρασκεύασμα και καλλιέργεια [21].

Το όριο ανίχνευσης στο άμεσο παρασκεύασμα των πτυέλων είναι 5000-10000 βάκιλοι ανά ml δείγματος. Η ευαισθησία κυμαίνεται μεταξύ 34-80% και είναι υψηλότερη σε άτομα με κοιλοτικές εξεργασίες και μικρότερη σε άτομα με ασθενή βήχα ή λιγότερο προχωρημένη νόσο [22].

Οι καλλιέργειες πτυέλων είναι απαραίτητες για την επιβεβαίωση της διάγνωσης της φυματίωσης. Απαιτούνται μόλις 10-100 μικροοργανισμοί για την ανίχνευση της φυματίωσης ενώ η ευαισθησία κυμαίνεται μεταξύ 80-93%. Η ειδικότητα είναι 98%. Οι καλλιέργειες επιτρέπουν μεγαλύτερη ευαισθησία στη διάγνωση της φυματίωσης, εξέταση για την ευαισθησία των φαρμάκων και την εύρεση των γονοτύπων στα πλαίσια επιδημιολογικών ερευνών [22]. Υπάρχουν τρεις τύποι καλλιέργειας. 1) Τα στερεά μέσα (Löwenstein- Jensen), 2) Τα βασιζόμενα σε άγαρ (Middlebrook 7H10 και 7H11) και 3) τα υγρά μέσα (Middlebrook 7H12 και άλλοι ζωμοί). Τα Löwenstein- Jensen και τα Middlebrook 7H10 και 7H11 μπορούν να ανιχνεύσουν μυκοβακτηρίδια σε λιγότερο από 4 εβδομάδες αλλά για να χαρακτηριστούν αρνητικές πρέπει να επωαστούν τουλάχιστον 6-8 εβδομάδες [23,24]. Μέσα καλλιέργειας που βασίζονται σε ζωμούς και συνδυάζονται με DNA probes (καθετήρες) παρέχουν αποτελέσματα σε λιγότερο από 2 εβδομάδες για δείγματα με άμεσο θετικό παρασκεύασμα και σε λίγο περισσότερο χρόνο για δείγματα με άμεσο παρασκεύασμα αρνητικό. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν η BACTEC 460TB και BACTEC MB9000 ραδιομετρική μέθοδος, η Mucobacterial Growth Indicator Tube μη

ραδιομετρική μέθοδος, η χειροκίνητη Septi-Chek AFB system (όλα τα παραπάνω από την εταιρεία Becton Dickinson Microbiology Systems, Franklin Lakes, NJ, USA) και η Extra Sensing Power and Myco-ESPCulture System II (Trek Diagnostic Systems, Cleveland, OH, USA) [23-25]. Νεότερες μέθοδοι καλλιέργειας βρίσκονται σε ανάπτυξη όπως η TK Medium (Salubris, Cambridge, MA) η οποία χρησιμοποιεί πολλαπλούς χρωματικούς δείκτες για γρήγορη ταυτοποίηση μικροοργανισμών.

Σε άτομα που αδυνατούν να αποχρέμψουν ή σε πτύελα με αρνητικό άμεσο παρασκεύασμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική των προκλητών πτυέλων για λήψη δείγματος για άμεσο παρασκεύασμα και καλλιέργεια. Η τεχνική των προκλητών πτυέλων θεωρείται ανώτερη από τη τεχνική της λήψης γαστρικού υγρού [26,27].

Σημαντικό ρόλο για τη διάγνωση της φυματίωσης σε άτομα χωρίς πτύελα ή με αρνητικό άμεσο παρασκεύασμα πτυέλων ή διαγνωστική αβεβαιότητα καταλαμβάνει η βρογχοσκόπηση. Η τεχνική της βρογχοσκόπησης περιλαμβάνει τη λήψη βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL), βρογχικών εκκρίσεων και βρογχικού βουρτσίσματος (brushing), διαβρογχικής βιοψίας καθώς και τη λήψη μεταβρογχοσκοπικών πτυέλων [28].

Συμπληρωματικό ρόλο στις συμβατικές μεθόδους διάγνωσης της ενεργού φυματίωσης παίζει η τεχνική της ενίσχυσης νουκλειικών οξέων (nucleic acid amplification assays). Με τη μέθοδο αυτή γίνεται ενίσχυση ειδικών για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης αλληλουχιών νουκλειικών οξέων με τη βοήθεια «καθετήρα» probe νουκλειικού οξέος. Δέκα βάκιλοι στο δείγμα είναι αρκετοί για να αποδώσουν θετικό αποτέλεσμα. Η ευαισθησία της τεχνικής είναι περίπου 80% ενώ η ειδικότητα φτάνει το 98-99%. Δυο είδη τεχνικών έχουν εγκριθεί στην Αμερική για δείγματα με θετική gram χρώση: 1) το AMPLICOR MTB (Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ, USA) το οποίο χρησιμοποιεί την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και 2) το Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct (MTD) test (Gen-Probe, San Diego, CA, USA), το οποίο χρησιμοποιεί μια ισοθερμική μέθοδο για να ανιχνεύσει και να ενισχύσει το ριβοσωμικό RNA του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης. Ένα αναδιορθωμένο MTD test εγκρίθηκε στην Αμερική για δείγματα τόσο με θετική όσο και αρνητική Gram χρώση και ονομάζεται E-MTD [22]. Σε μελέτες που έγιναν μεταξύ MTD και AMPLICOR το MTD έχει μικρό πλεονέκτημα [29]. Μια άλλη τεχνική που χρησιμοποιείται είναι το LCx test που βασίζεται στη αλυσιδωτή αντίδραση λιγάσης [30].

Επί διογκώσεως των λεμφαδένων των πυλών και του μεσοθωρακίου, όταν η διάγνωση δεν τίθεται με άλλον τρόπο μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μεσοθωρακοσκόπηση [31].

Από τον εργαστηριακό έλεγχο μπορούν να παρατηρηθούν φυσιολογικά ή κατώτερα του φυσιολογικού στον αριθμό λευκοκύτταρα αν και δεν είναι ασυνήθιστη μια ελαφρά ως μέτρια λευκοκυττάρωση. Μερικές φορές μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση των μονοκύτταρων και των ηωσινοφίλων, ελάττωση των λεμφοκυττάρων και αύξηση των άωρων μορφών των ουδετεροφίλων. Μετρίου βαθμού ορθόχρωμη αναιμία είναι συνηθισμένο εύρημα, ενώ σοβαρή αναιμία είναι σπάνια εκτός και αν υπάρχει κεχροειδής διασπορά, επανειλημμένες αιμοπτύσεις ή φυματίωση του γαστρεντερικού. Οι ηπατικές βιοχημικές εξετάσεις (τρανσαμινάσες, ALP) είναι δυνατόν να είναι διαταραγμένες στη μέτρια ή προχωρημένη φυματίωση. Τέλος η ανεύρεση άσηπτης πτυούρας, δηλαδή η ανεύρεση άφθονων πτυοσφαιρίων στη γενική ούρων αλλά αρνητικής Gram χρώσης και καλλιέργειας μας βάζει την υποψία φυματίωσης.

Μέχρι πρόσφατα η ενδοδερμική φυματινοαντίδραση Mantoux (TST) ήταν η μόνη μέθοδος αξιολόγησης της μόλυνσης από μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Πρόσφατα αναπτύχθηκαν *in vitro* ανοσοδιαγνωστικοί μέθοδοι οι οποίοι ονομάζονται interferon (IFN)- $\gamma$  release assays (IGRAs) και βασίζονται στην απελευθέρωση ιντερφερόνης-  $\gamma$  από ευαισθητοποιημένα T- λεμφοκύτταρα ως απάντηση σε ειδικά για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης αντιγόνα. Υπάρχουν δύο εμπορικά διαθέσιμα IGRAs: 1) το Quantiferon-TB Gold assay (Cellestis, Carnegie, Australia), το οποίο υπολογίζει τις συγκεντώσεις της IFN- $\gamma$  με τη μέθοδο της ανοσοπροσφορητικής ανάλυσης στερεάς φάσης (ELISA) και 2) το T-SPOT TB assay (Oxford Immunotec, Oxford, UK), το οποίο απαριθμεί τα T-λεμφοκύτταρα που απελευθερώνουν IFN- $\gamma$  με την εξυμοσυνδεδεμένη μέθοδο της κηλίδας (ELISPOT). Στο πιο πρόσφατο Quantiferon- TB Gold *in-tube* assay το αίμα συγκεντρώνεται απευθείας σε σωλήνες που περιέχουν ειδικά για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης αντιγόνα ESAT-6, CFP-10 και TB7.7 [32,33].

Τα πιο συχνά νοσήματα που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά τη διαφορική διάγνωση της φυματίωσης είναι οι κοινές πνευμονίες, το βρογχογενές καρκίνωμα, το πνευμονικό απόστημα, η χρόνια πνευμονική ακτινομυκητίαση, το πνευμονικό έμφρακτο, η σαρκοείδωση, ενώ στην Αμερική και στην Αφρική πρέπει να ληφθούν υπόψη η κοκκιοειδομύκωση και η ιστοπλάσμωση.

Στη διαφορική διάγνωση από την κοινή πνευμονία εκτός από την καλή κλινική εξέταση και τη λεπτομερή λήψη ιστορικού επαφών θα βοηθήσουν η Mantoux, το άμεσο παρασκεύασμα και η καλλιέργεια πτυέλων για βακίλλους Koch και κοινά μικρόβια, η αρχική ακτινογραφία θώρακος καθώς και η επαναληπτική μετά από 15-20 ημέρες.

Η διαφορική διάγνωση από το βρογχογενή καρκίνο πρέπει να γίνεται στα άτομα με ύποπτη κλινική εικόνα, άνω των 40 ετών, τα οποία είναι καπνιστές κυρίως αν υπάρχει ακτινολογική εικόνα ατελεκτασίας. Η ακτινογραφία και η αξονική θώρακος, το άμεσο παρασκεύασμα, η καλλιέργεια και οι επανειλημμένες κυτταρολογικές εξετάσεις πτυέλων ή υλικών που ελήφθησαν με τη βρογχοσκόπηση, η άμεση οπτική εικόνα της βρογχοσκόπησης καθώς και η λήψη BAL, η λήψη υλικού διαβρογχικά ή διατοιχωματικά ακόμη και η θωρακοτομή θα μπορούσαν να βοηθήσουν στη διαφοροδιάγνωση ανάλογα με τη θέση της βλάβης.

Στη διαφοροδιάγνωση μεταξύ φυματίωσης και πνευμονικού αποστήματος θα βοηθήσουν: το ιστορικό (στο απόστημα μπορεί να αναφέρουν απώλεια αισθήσεων λόγω ζάλης ή αλκοολισμού, κακή στοματική υγιεινή, ενώ το ιστορικό είναι συνήθως βραχύτερο), η ακτινογραφία θώρακος (οι φυματικές κοιλότητες συνήθως δεν εμφανίζουν υδραερικό επίπεδο σε αντίθεση με τις κοιλότητες από κοινά μικρόβια), το άμεσο παρασκεύασμα και η καλλιέργεια πτυέλων για κοινά μικρόβια και β-Koch.

Η αναερόβια καλλιέργεια για την ανεύρεση ακτινομυκήτων καθώς και η περιουσιτίδα των πλευρών ενισχύει τη διάγνωση της χρόνιας πνευμονικής ακτινομυκητιάσεως.

Η παρουσία παραγόντων προδιάθεσης στο ιστορικό για πνευμονικό έμφρακτο και οι γρήγορες ακτινολογικές μεταβολές (από την περιφέρεια προς το κέντρο ως τηκόμενος πάγος) βοηθούν στη διαφορική διάγνωση με τη φυματίωση

Η αρνητική Mantoux, οι αρνητικές καλλιέργειες πτυέλων, ο λόγος CD4/CD8 στο BAL και η χρήση της βρογχοσκόπησης μπορούν να βοηθήσουν στο διαχωρισμό μεταξύ φυματίωσης και σαρκοειδωσης.

Τέλος η διάγνωση της ιστοπλάσμωσης και της κοκκιοειδομύκωσης θα γίνει με ορολογικές εξετάσεις και διαβρογχική βιοψία πνεύμονος.

Τα νοσήματα που πρέπει να ληφθούν υπόψη στη διαφορική διάγνωση της αναπνευστικής φυματίωσης αναπτύσσονται με λεπτομέρεια στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 4. Διαφορική διάγνωση από άλλα πνευμονικά νοσήματα

Δομώξεις	Κακοήθειες	Αγγειίτιδες	Πνευμονικό έμφρακτο	Ινώδης νόσος	Εξωγενής αλλεργική κυψελιδίτιδα	Σαρκοείδωση
Βακτήρια (Staphylococcus, klebsiella, nocardia)	Βρογχογενές καρκίνωμα	Wegener's				Ήττα (αμφοτερόπλευρη πύλαια λεμφαδενοπάθεια)
Μelioidosis(σοβαρή νεκρωτική πνευμονία που ενδημεί σε Άπω Ανατολή)	Δέμφωμα	Οζώδης πολυαρτηρίτιδα				Νεκρωτική(πολλές βλάβες, κολότητες)
Σε HIV ασθενείς (pneumocystis jiroveci, CMV, σάρκαμα Kaposi)	Λευγαμία	Ρευματοειδείς όζοι				
Παραστικές (παρονομίαση, υδατίδα κύστη)	Κυψελιδικό καρκίνωμα	Οργανωμένη πνευμονία				
Ιογενή πνευμονία						
Μύκητες (ιστόπλασμα, κοκκidioμυκωσις)						
Άλλα μυκοβακτηρίδια(mycobacterium avium intracellulare complex, m. Malmoense, m. Kansasi, m. Xenopi, m. chelonae)						

Πίνακας 5. Διαφορική διάγνωση από πλευριτική συλλογή

Μεταστατικές κακοήθειες(κυρίως μαστός, ωοθήκες)
Βρογχογενές καρκίνωμα
Μεσοθηλίωμα
Πνευμονικό έμφρακτο
Αυτοάνοση νόσος
Ρευματοειδή αρθρίτιδα
Παραπνευμονική συλλογή, εμπύημα
Συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια
Χυλώδης συλλογή

Πίνακας 6. Διαφορική διάγνωση για διόγκωση μεσοθωρακίου

Καρκίνωμα
Λέμφωμα
Σαρκοείδωση
Θύωμα
Αμάρτωμα
Νευροίνωμα

Πίνακας 7. Διαφορική διάγνωση από κεγχροειδή (milliary) νόσο

Νοκαρδίαση
Μυκητιάσεις
Ιογενείς λοιμώξεις
Πνευμονοκονίαση
Σαρκοείδωση
Μεταστατικό καρκίνωμα
Ιστιοκύτωση X
Αμυλοείδωση
Κυψελιδική μικρολιθίαση

(Πίνακας από: PDO Davies, PF Barnes, SB Gordon. Clinical tuberculosis, Fourth Edition 2008)

## 1.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Η λίστα των παραγόντων κινδύνου για την ανάπτυξη φυματίωσης είναι μεγάλη και συνεχώς διογκώνεται. Η ανάλυση της έχει σαν σκοπό την ταυτοποίηση των κυριότερων αιτιολογικών και μετατρέψιμων παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν την επιδημιολογία της φυματίωσης. Οι παράγοντες κινδύνου σχετίζονται με 1) την πηγή μόλυνσης: α) άνθρωπος, β) ζώα (βοοειδή), 2) τη λοιμογόνο δύναμη του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης (αριθμός βακίλων, συνθήκες μετάδοσης), 3) Η τοξικότητα του βακίλου, 4) ο ξενιστής: α) γενετικοί, β) φυσιολογικοί (ηλικία, φύλο, κύηση) γ) περιβαλλοντικοί (διατροφή, εργασία, συνθήκες ζωής), δ) τοξικοί (αλκοόλ, κάπνισμα), ε) ανοσολογικοί, στ) παράγοντες εξασθένησης του οργανισμού (σακχαρώδης διαβήτης, γαστρεκτομή).

### 1.4.1.α) Ο άνθρωπος ως πηγή μόλυνσης

Με την επίτευξη του ελέγχου της βοείου τύπου φυματίωσης, ο άνθρωπος έχει γίνει η συχνότερη πηγή μόλυνσης. Τα πτύελα αποτελούν τον κυριότερο τρόπο μετάδοσης ενώ μικρότερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα εκκρίματα από τους παραρρίνιους κόλπους, τα ούρα, η μετάδοση από το γαστρεντερικό σύστημα, η επαφή με μολυσμένες επιφάνειες.

Η εκτίναξη από το στόμα ή τη μύτη των εκκρίσεων του αναπνευστικού του φυματικού ασθενούς γίνεται υπό τη μορφή σταγονιδίων. Τα σταγονίδια εκτοξεύονται με το βήχα, τον παρμό, την ομιλία, τον γέλωτα. Μετά την εκτίναξη το υγρό στοιχείο των σταγονιδίων εξατμίζεται ταχέως αφήνοντας ένα μικρό στερεό υλικό, τον πυρήνα του σταγονιδίου, που μπορεί να περιέχει το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Ο αριθμός των βακίλων που περιέχονται στο σωματίδιο είναι ανάλογος με το μέγεθος του. Οι λεπτόρρευστες εκκρίσεις νεφελοποιούνται ευκολότερα από τις παχύρρευστες και μάλιστα σε μικρότερα σωματίδια αυξάνοντας τη μολυσματικότητα ενώ όσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος των βρογχικών εκκρίσεων τόσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των σταγονιδίων.

Η μολυσματικότητα του ανθρώπου εξαρτάται και από την μορφολογία και έκταση της πνευμονικής φυματίωσης. Οι οζώδεις και συμπαγείς βλάβες περιέχουν περίπου  $10^2 - 10^4$  βακίλους ενώ οι κοιλοτικές αλλοιώσεις περιέχουν  $10^7 - 10^9$  βακίλους αυξάνοντας τη μολυσματικότητα.

Άτομα που έρχονται σε επαφή με ασθενείς με θετικό άμεσο παρασκεύασμα για B.Koch εμφανίζουν μεγαλύτερη επίπτωση της μόλυνσης σε σχέση με άτομα που έρχονται



σε επαφή με ασθενείς με αρνητικό άμεσο παρασκεύασμα και θετική ή αρνητική καλλιέργεια πτυέλων.

Τέλος η έγκαιρη έναρξη θεραπείας μειώνει τη μεταδοτικότητα της φυματίωσης τόσο περιορίζοντας το μικροβιακό πληθυσμό στους πνεύμονες όσο και επιτυγχάνοντας τη μείωση του βήχα. Ο βήχας μειώνεται κατά 40% μετά από μιας εβδομάδας θεραπεία και 65% μετά από δύο εβδομάδες [34].

#### 1.4.1.β) Τα βοοειδή ως πηγή μόλυνσης

Στο παρελθόν η φυματίωση η οποία προκαλείτο από βακίλους βόοειου τύπου ήταν συχνότερα μη πνευμονική. Η πηγή μόλυνσης ήταν το μολυσμένο γάλα και η πρωτοπαθής εστία ήταν είτε οι αμυγδαλές με συνοδό τραχηλική λεμφαδενοπάθεια ή το γαστρεντερικό σύστημα με συνοδό μεσεντέριο λεμφαδενίτιδα. Από το τέλος του 1960 εξαιτίας της θεραπείας και της μείωσης των μολυσμένων ζώων και της παστερίωσης του γάλακτος τα βοοειδή δεν αποτελούν πια συχνή πηγή μόλυνσης.

#### 1.4.2 Η λοιμογόνος δύναμη του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης

Το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης μεταφέρεται με τους πυρήνες των σωματιδίων. Τα μεγάλα σταγονίδια εναποτίθενται κυρίως στους αεραγωγούς, από όπου απομακρύνονται δια της βλεννοκροσσωτής κάθαρσης. Τα μικρά σωματίδια (<5μm) μπορούν να φτάσουν στις κυψελίδες μεταφέροντας 1-5 βακίλους, αριθμό επαρκή για την ανάπτυξη φυματικής μόλυνσης. Αναφέρεται ότι για τον άνθρωπο απαιτούνται περισσότερα σωματίδια, περίπου 20-200. Ο αέρας αποτελεί το μέσο μεταφοράς των μυοβακτηριδίων από την πηγή μόλυνσης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι το ποσοστό των βακίλων που επιζεί στα αιωρούμενα στον αέρα σωματίδια, κάτω από σταθερές συνθήκες του περιβάλλοντος, είναι 60-71% για 3 ώρες, 48-56% για 6 ώρες και 28-32% για 9 ώρες κατανοούμε ότι η συγκέντρωση των βακίλων και επομένως η μολυσματικότητα τους εξαρτάται από 1)το μέγεθος του χώρου(όσο μεγαλύτερος ο χώρος τόσο μικρότερη η συγκέντρωση, 2)από το βαθμό ανανεώσεως του αέρα (η συχνή ανανέωση, όχι από κλειστά συστήματα κλιματισμού, μειώνει τη συγκέντρωση ζώντων βακίλων), 3)από το χρόνο έκθεσης (μακράς διάρκειας έκθεση αυξάνει τον κίνδυνο), 4) από το βαθμό του συνωστισμού και της επαφής ενός ατόμου με τη πηγή μόλυνσης [35,36].

### 1.4.3 Η τοξικότητα του βακίλου

Η μελέτη του γονότυπου (genotyping) έχει επιτρέψει την ιχνηλάτηση ειδών μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης καθώς αυτά πολλαπλασιάζονται είτε τοπικά μέσα στις κοινότητες, είτε σε παγκόσμιο επίπεδο. Μερικά γένη του μυκοβακτηριδίου συναντώνται σπάνια ενώ άλλα είναι ευρέως διαδεδομένα τόσο γεωγραφικά όσο και χρονικά. Τα γένη που ανήκουν στην οικογένεια Beijing έχουν ανιχνευθεί σε δείγματα από όλο το κόσμο συμπεριλαμβανομένων την Κίνα, πρώην χώρες της Σοβιετικής Ένωσης, στην Εσθονία, στην Ευρώπη και στη Νότια Αφρική [37,38]. Η ευρεία διάδοση αυτών των ειδών πιθανόν να οφείλεται σε πλεονεκτική φυσική επιλογή τους (selective advantage), στο γεγονός ότι εξατμίζονται πιο άμεσα ή ότι μπορούν πιο γρήγορα να οδηγήσουν από λοίμωξη σε νόσηση [39]. Κάποιοι άλλοι γονότυποι εκτός της οικογένειας Beijing επικρατούν σε κάποιες άλλες περιοχές κυρίως στην Αφρική [40].

Έρευνες που έχουν γίνει υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα γένη μυκοβακτηριδίου που είναι ανθεκτικά στα φάρμακα είναι λιγότερο πιθανόν να οδηγήσουν σε λοίμωξη σε σχέση με τα ευαίσθητα. Πρέπει όμως να λάβουμε υπόψη τις περιπτώσεις όπου η ανθεκτικότητα των ειδών στα φάρμακα δε γίνεται εγκαίρως αντιληπτή με αποτέλεσμα να μη χρησιμοποιούνται τα σωστά φάρμακα και η μειωμένη ικανότητα των ειδών για νόσηση να αντισταθμίζεται προκαλώντας δευτερογενή κρούσματα [41].

#### 1.4.4.α Γενετικοί παράγοντες

Έχει αναφερθεί ότι σε μονοζυγώτες διδύμους, εάν ο ένας πάθει φυματίωση, ο άλλος έχει τριπλάσιες πιθανότητες να εμφανίσει τη νόσο σε σχέση με άλλους δίδυμους αδερφούς.

Οι μαύροι της Αφρικής είναι πιο επιρρεπείς στην εμφάνιση της νόσου.

Μελέτες που έχουν γίνει κατέδειξαν ότι ανάμεσα στα γονίδια που σχετίζονται με ευπάθεια στη φυματίωση είναι αυτά που κωδικοποιούν του υποδοχέα βιταμίνης D, την πρωτεΐνη των μακροφάγων την σχετιζόμενη με φυσική αντίσταση (natural resistance-associated macrophage protein), HLA, και την mannose binding lectin (MBL)[ 12-17].

#### 1.4.4.β Φυσιολογικοί παράγοντες

##### 1.4.4.β.1 Ηλικία

Όσον αφορά στην ηλικία η φυματίωση αποτελεί κυρίως νόσο των ενηλίκων. Τα παιδιά αποτελούν περίπου το 10% των περιπτώσεων. Έχει παρατηρηθεί ότι όσο το

ποσοστό της μεταδοτικότητας σε μια περιοχή μειώνεται τόσο αυξάνεται ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών.

#### 1.4.4.β.2 Φύλο

Τα περισσότερα περιστατικά φυματίωσης παγκοσμίως αφορούν τους άνδρες. Το φαινόμενο είναι πιο έντονο σε χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης. Υπάρχουν όμως μελέτες που δείχνουν ότι οι γυναίκες εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο νόσησης από πολυανθεκτική φυματίωση (MDR- TB)[8].

#### 1.4.4.β.3 Κύηση

Σύμφωνα με έρευνες η εμφάνιση κύησης σε ασθενείς με φυματίωση στις αναπτυγμένες χώρες έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια. Αυτό οφείλεται στην αλλαγή στο όριο ηλικίας εμφάνισης της φυματίωσης, στην έκρηξη της μετανάστευσης, στην αύξηση των κρουσμάτων HIV. Μελέτες, όμως, καταδεικνύουν πως η κύηση και η λοχεία δεν αποτελούν παράγοντα κινδύνου για την ανάπτυξη φυματίωσης. Επίσης η κλινική εικόνα της φυματίωσης δεν διαφέρει μεταξύ εγκύων και μη γυναικών αλλά η διάγνωση στις έγκυες γυναίκες μπορεί να καθυστερήσει λόγω των αρχικών μη ειδικών συμπτωμάτων [42-44]

#### 1.4.4.γ Περιβαλλοντικοί παράγοντες

##### 1.4.4.γ.1 Διατροφή

Σύμφωνα με έρευνες ο υποσιτισμός αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση φυματίωσης, πιθανότατα λόγω της επίδρασης του στην κυτταρική ανοσία, η οποία αποτελεί τη βασική άμυνα του ξενιστή [15].

##### 1.4.4.γ.2 Επάγγελμα

Ιατρικό, νοσηλευτικό προσωπικό και γενικότερα εργαζόμενοι στο χώρο υγείας, οι οποίοι έρχονται σε επαφή με ασθενείς που πάσχουν από φυματίωση εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα νόσησης [12].

Η πυριτίαση, η επικρατέστερη από τις πνευμονοκονιώσεις, οφείλεται στην εισπνοή σωματιδίων κρυσταλλικού πυριτίου. Εργαζόμενοι σε επαφή με πυρίτιο, ακόμη και αν δε νοσούν από πυριτίαση εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης φυματίωσης σε

σχέση με υγιή άτομα,. Η πιθανότητα είναι 2.8-3.9 φορές μεγαλύτερη ανάλογα με τη βαρύτητα της πυριτιάσης [45].

#### 1.4.4.γ.3 Συνθήκες διαβίωσης

Αναλύσεις με τη χρήση πολλών μεταβλητών κατέδειξαν ότι η διαβίωση σε φυλακή αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση επιδημίας φυματίωσης.

Έχει διαπιστωθεί ότι οι άστεγοι σχετίζονται με αυξημένο ποσοστό μόλυνσεως από φυματίωση, εμφάνιση πολυανθεκτικών μορφών της νόσου, χαμηλή συμμόρφωση στην αγωγή και αδυναμία παρακολούθησης [46].

#### 1.4.4.δ Τοξικοί παράγοντες

##### 1.4.4.δ.1 Αλκοόλ

Σύμφωνα με έρευνες είναι κατάδηλη η σχέση του αλκοολισμού με τον κίνδυνο εμφάνισεως φυματίωσης. Ο κίνδυνος εμφάνισης είναι ιδιαίτερα αυξημένος σε άτομα που καταναλώνουν πάνω από 40 γραμμάρια αλκοόλ την ημέρα. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην επίδραση του αλκοόλ στην άμυνα του οργανισμού είτε απευθείας είτε λόγω κακής διατροφής, στις ειδικές κοινωνικές συναναστροφές των αλκοολικών, ακόμα και σε συνυπάρχοντα, λόγω της χρήσης αλκοόλ, συνοδά νοσήματα [47].

##### 1.4.4.δ.2 Ναρκωτικά φάρμακα

Η χρήση ναρκωτικών φαρμάκων έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί ακόμα έναν παράγοντα κινδύνου για τη νόσηση από φυματίωση, την εμφάνιση κρουσμάτων με άμεσο παρασκεύασμα θετικό ενώ σχετίζεται με την εμφάνιση πολυανθεκτικών μορφών φυματίωσης [46]

##### 1.4.4.δ.3 Ενεργητικό και παθητικό κάπνισμα

Σύμφωνα με μελέτες το κάπνισμα ενοχοποιείται ως παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση φυματίωσης. Ο σχετικός κίνδυνος για μόλυνση υπολογίζεται 1.73 (95% CI, 1.46-2.04) και για νόσηση 2.33 (95% CI, 1.97-2.75) εως 2.66 (95% CI, 2.15-3.28). Οι απόψεις δίστανται ως προς την επίδραση του καπνού στην αύξηση της θνητότητας από φυματίωση σε άτομα που ήδη νοσούν.

Αν και υπάρχουν στοιχεία που ενισχύουν τη σχέση μεταξύ παθητικού καπνίσματος και φυματίωσης καθώς και τη χρήση της καύσης βιομάζας για την παραγωγή καυσίμων

στο οικιακό περιβάλλον με τη φυματίωση οι παραπάνω συσχετισμοί δεν είναι τόσο ισχυροί και χρειάζεται να γίνει περαιτέρω έρευνα [16,48]

#### 1.4.4.ε Ανοσολογικοί παράγοντες

##### 1.4.4.ε.1 Ασθενείς με AIDS/HIV

Ο ιός HIV στοχεύοντας στα CD4- T λεμφοκύτταρα και μειώνοντας την κυτταρική άμυνα αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση φυματίωσης[49]. Σε ασθενείς που έχουν μολυνθεί ταυτόχρονα από HIV και φυματίωση ο ετήσιος κίνδυνος εμφάνισης ενεργού φυματίωσης είναι 5-15%. Ο κίνδυνος ξεκινάει από το πρώτο χρόνο μόλυνσης με HIV και αυξάνεται κάθε χρόνο καθώς το σύστημα άμυνας του οργανισμού καταστρέφεται [50]. Το 2000 υπολογίζονταν σε 11.4 εκατομμύρια οι ενήλικοι που είχαν μολυνθεί ταυτόχρονα από φυματίωση και HIV, με τους περισσότερους να κατοικούν στην υποσαχάρια Αφρική [51].

##### 1.4.4.ε.2 TNF-a ανταγωνιστές

Ο αντι TNF-a παράγοντας έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία διάφορων φλεγμονωδών νόσων, όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, σπονδυλοαρθρίτιδες, νόσος Behçet, ψωρίαση. Σύμφωνα με έρευνες η χρήση του αντι TNF-a σχετίζεται με την επαναενεργοποίηση της φυματίωσης. Ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος με τη χρήση infliximab και adalimumab σε σχέση με etanercept. Μελέτες έδειξαν ότι μια υποομάδα εκτελεστών κυττάρων μνήμης (effector memory cells) CD8 λεμφοκυττάρων, τα οποία συμβάλλουν στη καταστροφή των ενδοκυττάρων βακίλων φυματίωσης, μειώνονται in vivo από το infliximab και είναι ευαίσθητα στη λύση με μεσολαβητή το συμπλήρωμα με τη χρήση infliximab in vitro [52-54].

##### 1.4.4.ε.3 Κορτικοστεροειδή

Η χρήση των κορτικοστεροειδών μπορεί να προκαλέσει μείωση της κυτταρικής ανοσίας οδηγώντας σε δραματική αύξηση του μυκοβακτηριδιακού πολλαπλασιασμού σε ασθενείς με λανθάνουσα λοίμωξη [55].

##### 1.4.4.ε.4 Κυκλοσπορίνη

Μια έρευνα έδειξε ότι η χρήση της κυκλοσπορίνης οδήγησε σε ανάπτυξη φυματίωσης σε 12-20% Πακιστανών που είχαν υποστεί μεταμόσχευση νεφρού [56].

#### 1.4.4.στ Παράγοντες εξασθένησης του οργανισμού

##### 1.4.4.στ.1 Σακχαρώδης διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα κινδύνου για φυματίωση. Διαβητικοί ασθενείς εμφανίζουν περίπου 3 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης φυματίωσης από υγιή άτομα. Υπάρχει μεγαλύτερος συσχετισμός σε ηλικίες κάτω των 40 ετών και σε χώρες με αυξημένη επίπτωση σε φυματίωση. Πιθανότατα η αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ σακχαρώδη διαβήτη και φυματίωσης βασίζεται στο ότι ο πρώτος βλάπτει τόσο τις εγγενείς όσο και τις επίκτητες ανοσολογικές απαντήσεις, που είναι απαραίτητες για την αντιμετώπιση του πολλαπλασιασμού των μυκοβακτηριδίων [57].

##### 1.4.4.στ.2 Γαστρεκτομή

Άτομα με καρκίνο του στομάχου ή έλκος στομάχου μπορεί να υποβληθούν σε γαστρεκτομή. Μελέτες δείχνουν ότι πιθανότατα η γαστρεκτομή μπορεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για επενεργοποίηση της φυματίωσης. Αναλύσεις της μειωμένης ανοχής στη γλυκόζη στα άτομα αυτά κατέδειξαν την ανάπτυξη οξυπεργλυκαιμίας (oxyhyperglucaemia) ή σακχαρώδη διαβήτη. Τα παραπάνω σε συνδυασμό με την κακή σίτιση αποτελούν παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη ενεργού φυματίωσης [58].

## 1.5 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η μόλυνση με το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης καταλήγει σε μια δυναμική αλληλεπίδραση του ξενιστή, των βακτηριακών και των περιβαλλοντικών παραγόντων με τελικό αποτέλεσμα ένα ετερογενές φάσμα κλινικών εκδηλώσεων και διαφορετικών σταδίων λοίμωξης και νόσησης. Επιδημιολογικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι προστατευτική άμυνα έναντι της φυματίωσης υπάρχει στους περισσότερους εκτεθειμένους οργανισμούς με αποτέλεσμα μόνο 5-10% αυτών που έχουν μολυνθεί να αναπτύσσουν νόσο καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής τους [59]. Η προστασία είναι πολύπλοκη και μπορεί να περιλαμβάνει πολλαπλά είδη κυττάρων, υποδοχέων, κυτταροκινών, χυμοκινών (chemokines), αντισωμάτων, του συμπληρώματος καθώς και μη επαρκώς μελετημένων πρωτεϊνών του ξενιστή.

### 1.5.1 ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΑΝΟΣΙΑ ΣΤΗ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ

Σε εκτεθειμένα, στο μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης, άτομα τόσο η εγγενής όσο και η επίκτητη ανοσία εμποδίζουν την εγκατάσταση της μόλυνσης και την εξέλιξη της σε νόσο. Η διέγερση Toll-like (TLRs) υποδοχέων στα μονοκύτταρα, κυψελιδικά μακροφάγα και στα δενδριτικά κύτταρα από το μυκοβακτηρίδιο και τα συστατικά του αποτελούν τη βάση της εγγενούς ανοσίας. Στη συνέχεια η ειδική επίκτητη ανοσία χαρακτηρίζεται από την επικρατούσα T-helper (T<sub>H</sub>) 1 απάντηση (IL-2, IFN-γ, TNF-α) και την καταστολή της T-helper 2 απάντησης (IL-4, IL-5, IL-13). Η αρχική αλληλεπίδραση μεταξύ του μυκοβακτηριδίου και των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων καθορίζει την ισορροπία μεταξύ T<sub>H</sub>1 και 2 ανοσίας.

Η τοπική ανοσολογική απάντηση χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη φλεγμονωδών μεσολαβητών, οι οποίοι είναι παρόντες στο αίμα, στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, στο πλευριτικό υγρό, στα πτύελα. Μερικοί από αυτούς τους μεσολαβητές είναι ανοσοκατασταλτικοί ή προ-αποπτωτικοί και εξαφανίζονται με την έναρξη της φαρμακευτικής αγωγής.

#### 1.5.1.α Εγγενής ανοσία

Η λοίμωξη της φυματίωσης συνήθως ξεκινάει με την εισπνοή σταγονιδίων που περιέχουν το μυκοβακτηρίδιο και τη μεταφορά τους μέχρι τις κυψελίδες. Εκεί το μυκοβακτηρίδιο εισέρχεται στα διαμέμοντα κυψελιδικά μακροφάγα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα προσφάτως στρατολογημένα μονοκύτταρα και τα αναπνευστικά επιθηλιακά κύτταρα. Υποδοχείς όπως του συμπληρώματος, της μανόζης (mannose), CD14, ο υποδοχέας της επιφανειοδραστικής πρωτεΐνης A έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να δεσμεύουν το μυκοβακτηρίδιο *in vitro* [60]. Το τελευταίο μπορεί να ενεργοποιήσει και το «μονοπάτι» του συμπληρώματος, να ωψονοποιηθεί από προϊόντα του συμπληρώματος και να δεσμευτεί από τους υποδοχείς 1,3,4 του συμπληρώματος [61]. Επίσης τα μυκοβακτηρίδια εκφράζουν επιφανειακούς πολυσακχαρίτες που μπορούν άμεσα να αλληλεπιδράσουν με τους υποδοχείς του συμπληρώματος [62]. Μετά την είσοδο τους στα κύτταρα λαμβάνει χώρα επεξεργασία και παρουσίαση των μυκοβακτηριδιακών αντιγόνων, στο πλαίσιο των μορίων συμπλέγματος μείζονος ιστοσυμβατότητας τάξεως I και II, στα CD8<sup>+</sup> T και στα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα. Η παρουσίαση των αντιγόνων μπορεί επίσης να γίνει μέσω πρωτότυπων CD1 μορίων [63] ή απροσδιόριστων υποδοχέων των διπλά αρνητικών (Va 24CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) T κυττάρων, φυσικών φονέων T κυττάρων (NKTs), ή γδ T

κυττάρων. Τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν Toll-like υποδοχείς που αναγνωρίζουν τα αντιγονικά μοτίβα ξεκινώντας ένα κανάλι μεταφοράς μηνυμάτων που αποκορυφώνεται με την ενεργοποίηση των NFκβ και την παραγωγή κυτταροκινών και χυμοκινών [64,65]. Αυτές οι κυτταροκίνες και οι χυμοκίνες είναι πολύ σημαντικές για την ενεργοποίηση της επίκτητης ανοσίας κατά των μυκοβακτηριδίων της φυματίωσης.

### 1.5.1.β Επίκτητη ανοσία

Τα T κύτταρα παίζουν κεντρικό ρόλο στην επίκτητη άμυνα τόσο των ενηλίκων όσο και των παιδιών [66,67]. Τα  $CD4^+$  T λεμφοκύτταρα είναι η κύρια πηγή της IFN- $\gamma$  και της IL-2 και σημαντικά για την επαγωγή απαντήσεων της καθυστερημένου τύπου υπερευαισθησίας (delayed-type hypersensitivity) και για την ανάπτυξη και διατήρηση απαντήσεων των  $CD8^+$  κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων [68].

Τα  $CD4^+$  T λεμφοκύτταρα συνδέονται άμεσα με την αναστολή της ανάπτυξης των μυκοβακτηριδίων στα μονοκύτταρα [69]. Τα ενεργοποιημένα  $CD4^+$  T λεμφοκύτταρα μπορούν να διαφοροποιηθούν σε  $T_H 1$  και  $T_H 2$  κύτταρα. Τα πρώτα παράγουν IFN- $\gamma$ , τον επικρατέστερο ενεργοποιητή των μακροφάγων και μονοκυττάρων, IL-2 και TNF- $\alpha$  [70]. Τα  $T_H 2$  κύτταρα παράγουν κυρίως IL-4, IL-5 και IL-13.

Τα  $CD8^+$  T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν διάφορα μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα όπως το ESAT-6, τα 85A και 85B, την 38kDa πρωτεΐνη και την 19kDa λιποπρωτεΐνη [71]. Τα  $CD8^+$  T κύτταρα-εκτελεστές (effector) του περιφερικού αίματος μπορούν επίσης να συνεισφέρουν στην παραγωγή IFN- $\gamma$  και TNF- $\alpha$  [72].

Κυτταροτοξικά μόρια όπως η περφορίνη(perforin), η γκρανουλοσίνη (granulysin) και η γκρανζύμη (granzyme) απελευθερώνονται από τα κυτταροτοξικά  $CD8^+$  και  $CD4^+$  κύτταρα αμέσως μετά την επαφή τους με τα μολυσμένα κύτταρα [73].

Μετά τη μυκοβακτηριδιακή μόλυνση ενεργοποιούνται εκτελεστικοί μηχανισμοί στα περιφερικά όργανα, όπως στους πνεύμονες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή εκτελεστών T κυττάρων μνήμης (Effector T memory cells) και κεντρικών T κυττάρων μνήμης (central memory T cells). Τα πρώτα είναι παρόντα κυρίως στους περιφερικούς ιστούς και στα σημεία φλεγμονής αναπτύσσοντας άμεσα δράση, ενώ τα δεύτερα ενδημούν στα όργανα του λεμφικού συστήματος και δεν μπορούν να δράσουν άμεσα. Κατά τη διάρκεια επαναμόλυνσης ή στην περίπτωση εμβολιασμού τα κεντρικά κύτταρα μνήμης πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται ώστε να εφοδιάσουν εκ νέου τη δεξαμενή των κυττάρων- εκτελεστών.



### 1.5.1.γ Χυμική ανοσία

Μέχρι πρόσφατα η χυμική ανοσία θεωρείτο ότι έπαιζε μικρό ή καθόλου ρόλο στην πορεία της μυκοβακτηριδιακής λοίμωξης. Πρόσφατα, όμως, δεδομένα από πειράματα σε επίμυες καταδεικνύουν ότι αντισώματα ειδικά έναντι arabinomannan μπορούν να μεταβάλλουν την πορεία της λοίμωξης αυξάνοντας την επιβίωση [74]. Επίσης αντισώματα έναντι του μυκοβακτηριδιακού lipoarabinomannan βρέθηκε ότι σχετίζονται με αντίσταση στη διασπορά της νόσου στα παιδιά [75].

Τα αντισώματα συμμετέχουν στην παθογένεια της νόσου των ενηλίκων αυξάνοντας τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και εμποδίζοντας τις κυτταροκίνες με αντιφλεγμονώδη δράση (downregulatory). Ειδικά PPD IgG1 αντισώματα επαυξάνουν την έκκριση TNF- $\alpha$ , IL-6 και IL-10 από PPD-διεγερμένα μονοκύτταρα σε ασθενείς με φυματίωση [76].

Η απάντηση των αντισωμάτων διαφέρει κατά την πορεία της λοίμωξης και νόσου από μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Πρόσφατη λοίμωξη συνδέεται με μετρήσιμη αντισωματική απάντηση [77]. Αντίθετα η λανθάνουσα λοίμωξη είναι συνήθως οροαρνητική, πιθανότατα λόγω ανεπαρκούς αντιγονικού ερεθίσματος [78]. Τα αντισώματα γίνονται μετρήσιμα καθώς η λανθάνουσα λοίμωξη εξελίσσεται σε ενεργό νόσο.

Επίσης έρευνες καταδεικνύουν ότι το προφίλ των αντισωμάτων διαφοροποιείται στα διαφορετικά στάδια της νόσου [79]. Έτσι ειδικοί δείκτες αντισωμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την έγκαιρη πρόβλεψη της πορείας της νόσου.

## 1.6 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ

Η κλασική ανοσολογική απάντηση ενός οργανισμού στη λοίμωξη από μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης είναι ο σχηματισμός κοκκιώματος. Το κοκκίωμα αποτελείται από μια τοπική συνάθροιση ενεργοποιημένων μακροφάγων. Τα μακροφάγα ενεργοποιούνται από κυτταροκίνες που εκκρίνονται από ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα.

Όταν αναφερόμαστε σε ενεργοποιημένα μακροφάγα περιγράφουμε μακροφάγα που έχουν υποστεί φαινοτυπικές, μορφολογικές και μεταβολικές αλλαγές σε επιθηλιοειδή κύτταρα.

Τα επιθηλιοειδή είναι μεγάλα κύτταρα με άφθονα ηωσινοφιλικά μιτοχόνδρια, κυτταρόπλασμα πλούσιο σε λυσοσώματα, ένα μεγάλο στρογγυλό ή επιμηκυμένο πυρήνα με εξέχον ηωσινοφιλικό πυρήνιο και ακαθόριστες αλληλεμπλεκόμενες και πτυχωτές

κυτταρικές μεμβράνες [80]. Η παραγωγή και έκκριση ενζύμων, κυττοκινών και ελεύθερων ριζών είναι αυξημένη στα επιθηλιοειδή κύτταρα καθιστώντας τα ικανά να αναστέλλουν, να σκοτώνουν και να «χωνεύουν» παράγοντες όπως το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης πιο άμεσα από τα ανενεργά μακροφάγα [81].

Πολλά κοκκιώματα περιέχουν πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα. Όταν οι πυρήνες είναι τυχαία κατανεμημένοι στο κυτταρόπλασμα ονομάζονται “foreign body giant cells”, ενώ όταν σχηματίζουν ένα περιφερικό όριο μέσα στο κύτταρο ονομάζονται “Langhans giant cells”. Τα δεύτερα αποτελούν την κύρια μορφή που βλέπουμε στη φυματίωση. Η λειτουργία τους είναι ασαφής. Διαθέτουν αυξημένη οξειδωτική και ενζυματική ικανότητα σε σχέση με τα μακροφάγα [82]. Μπορούν να καταστρέψουν φαγοκυτταρωμένους βακίλους και ταυτόχρονα να λειτουργήσουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα [83].

Άλλα φλεγμονώδη κύτταρα που βρίσκονται μέσα ή γύρω από το κοκκίωμα είναι τα  $CD8^+$  και  $CD4^+$  λεμφοκύτταρα. Τα  $CD4^+$  λεμφοκύτταρα βρίσκονται μέσα και γύρω από το κοκκίωμα ενώ τα  $CD8^+$  βρίσκονται κυρίως σε ένα οριακό στεφάνι γύρω από τα επιθηλιοειδή κύτταρα. Η ολική διανομή και αναλογία των παραπάνω κυττάρων εξαρτάται και από τον ανοσολογικό τύπο της φυματίωσης [84].

Η κυριότερη λειτουργία των  $CD4^+$  λεμφοκυττάρων είναι η έκκριση  $IFN-\gamma$ , η οποία ενεργοποιεί τα μακροφάγα προκαλώντας έτσι το σχηματισμό του κοκκιώματος [85]. Στους ασθενείς με HIV λόγω της σταδιακής καταστροφής των  $CD4^+$  κυττάρων περιστασιακά μπορεί να παρατηρηθεί ανικανότητα σχηματισμού κοκκιώματος. Σε αυτά τα άτομα η παραγωγή  $IFN-\gamma$  και η ενεργοποίηση των μακροφάγων μπορεί να γίνει από τα κύτταρα φυσικούς φονείς (natural killers). Τέλος, ο ρόλος των  $CD8^+$  λεμφοκυττάρων στο φυματιώδες κοκκίωμα δεν έχει διευκρινισθεί [86].

Χαρακτηριστικό των κοκκιωμάτων στη φυματίωση είναι ότι συγχωνεύονται σχηματίζοντας μεγαλύτερες, ορατές μάζες, οι οποίες νεκρώνονται δημιουργώντας μονές ή ενωμένες βλάβες. Μακροσκοπικά οι βλάβες αυτές είναι ωχρές και κιτρινωπές για αυτό το λόγο χαρακτηρίζονται ως τυροειδοποιημένες (caseous). Τμήμα της νέκρωσης αυτής οφείλεται στην απόπτωση μακροφάγων και T λεμφοκυττάρων, τμήμα της οφείλεται στο έμφρακτο που δημιουργείται από την τοπική μικροαγγειακή θρόμβωση που ακολουθεί την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και τον ερεθισμό παραγόντων πήξης [87]. Η νέκρωση αυτή αποτελεί έναν τρόπο να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός των βακίλων, αν και δεν είναι απαραίτητο ότι οι τελευταίοι πεθαίνουν αλλά μπορούν να βρίσκονται σε λανθάνουσα κατάσταση για μεγάλη χρονική περίοδο. Ιστολογικά, η τυροειδοποιημένη

νέκρωση είναι ένας μαλακός ηωσινοφιλικός ιστός στον οποίον τα νεκρά πλέον μακροφάγα μόλις και είναι ορατά, δεν υπάρχουν πυρήνες και τα κατεστραμμένα τμήματα τους είναι αραιά ή απουσιάζουν. Στην περιφέρεια της νέκρωσης τα μακροφάγα μετατρέπονται σε ενεργοποιημένα επιθηλιοειδή κύτταρα- κοκκιώματα [88]. Στα άτομα με επαρκή ανοσία το τυροειδοποιημένο υλικό εξοβελίζεται σταδιακά από κοκκιώδη ιστό και όλη η βλάβη μετατρέπεται σε ουλή με ή χωρίς υπολειμματική νεκρωτική εστία. Στη συνέχεια σε ορισμένα άτομα μπορεί να αναπτυχθεί δυστροφική ασβεστοποίηση ή ακόμη και οστεοποίηση ενώ σε άλλα η ουλή μπορεί να απορροφηθεί εντελώς. Επίσης η τυροειδής αλλοίωση μπορεί να ρευστοποιηθεί σχηματίζοντας μια κοιλότητα δια εκκενώσεως του ρευστού τυροειδούς υλικού εντός του απαγωγού βρόγχου.

## 1.7 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ

Από παλαιά είχαν γίνει προσπάθειες για την ταξινόμηση της φυματίωσης από κλινικούς, ακτινολόγους, παθολόγους και μικροβιολόγους ιατρούς, οι οποίες όμως δεν κάλυπταν συνολικά τη νόσο. Για να καλυφθεί αυτή η έλλειψη η Αμερικάνικη Εταιρεία Θώρακος σχεδίασε και πρότεινε μια νέα ταξινόμηση η οποία βασίζεται στην έκθεση του ανθρώπου στο μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης, στη μόλυνση και στη νόσηση. Σύμφωνα με αυτή την ταξινόμηση διακρίνονται πέντε κατηγορίες.

**Κατηγορία 0: Χωρίς έκθεση στη φυματική μόλυνση.** Τα άτομα δεν έχουν έρθει σε επαφή με φυματικούς ασθενείς και η δερμοαντίδραση στη φυματίνη είναι αρνητική.

**Κατηγορία 1: Έκθεση αλλά χωρίς αποδεδειγμένη μόλυνση.** Τα άτομα έχουν έρθει σε επαφή με φυματικούς ασθενείς. Αν έχουν μολυνθεί πρόσφατα η δερμοαντίδραση στη φυματίνη μπορεί να είναι αρνητική (προαλλεργική περίοδος), καθότι από την ημέρα της μόλυνσης μέχρι να καταστεί θετική μπορεί να χρειαστεί να περάσουν 2-3 μήνες.

**Κατηγορία 2: Λανθάνουσα φυματική μόλυνση χωρίς νόσηση.** Τα άτομα έχουν μολυνθεί αλλά δεν νοσούν και η Mantoux είναι θετική. Δεν εμφανίζουν συμπτώματα της νόσου, η ακτινογραφία είναι αρνητική και οι μικροβιολογικές εξετάσεις για βάκιλο του Koch είναι αρνητικές.

**Κατηγορία 3: Φυματίωση κλινικά ενεργός.** Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται οι ασθενείς με ενεργό φυματίωση, η οποία έχει αποδειχθεί κλινικά, βακτηριολογικά ή και ακτινολογικά.

**Κατηγορία 4: Κλινικά ανενεργός φυματίωση.** Τα άτομα έχουν ιστορικό φυματίωσης στο παρελθόν ή παθολογικά ευρήματα στην ακτινογραφία θώρακος τα οποία παραμένουν σταθερά. Η δερμοαντίδραση στη φυματίνη είναι θετική, οι βακτηριολογικές εξετάσεις είναι αρνητικές ενώ δεν υπάρχουν κλινικά ή ακτινολογικά ευρήματα ενεργού νόσου.

**Κατηγορία 5: Ύποπτη φυματίωση.** Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι ύποπτες για φυματίωση περιπτώσεις στις οποίες δεν έχει ολοκληρωθεί η διάγνωση, δηλαδή αν πρόκειται για ενεργό ή ανενεργό φυματίωση. Σε αυτή την κατηγορία τα άτομα δεν πρέπει να παραμείνουν περισσότερο από τρεις μήνες.

## 1.8 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

### 1.8.1. Πνευμονική φυματίωση

Η πνευμονική φυματίωση ορίζεται ως η ενεργός λοίμωξη των πνευμόνων, της υπεζωκοτικής κοιλότητας, των μεσοθωρακικών λεμφαδένων ή του λάρυγγα από μυκοβακτηρίδια που ανήκουν στο σύμπλεγμα του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης και συγκεκριμένα τα *mycobacterium tuberculosis*, *mycobacterium bovis*, *mycobacterium africanum* και *mycobacterium microti* [89].

Η πνευμονική λοίμωξη μπορεί να διαχωριστεί περαιτέρω σε πρωτοπαθή και μετά-πρωτοπαθή νόσο.

Η πρωτοπαθής λοίμωξη εμφανίζεται κυρίως στα παιδιά αλλά σε περιοχές με χαμηλό επιπολασμό της νόσου εμφανίζεται συχνά και σε μεγαλύτερης ηλικίας άτομα ή σε ανοσοκατεσταλμένους, οι οποίοι δεν είχαν εκτεθεί σε φυματίωση στην παιδική ηλικία [90,91]. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων είναι ασυμπτωματική και η κλινική διάγνωση γίνεται κυρίως με τη φυματινοαντίδραση και τα ακτινολογικά ευρήματα της λεμφαδενοπάθειας και των πνευμονικών διηθήσεων στο μέσο και κάτω λοβό [89,92]. Σχεδόν το 90% των περιπτώσεων εμφανίζουν πυλαία ή παρατραχειακή λεμφαδενοπάθεια [93]. Σε μικρό ποσοστό, όμως, δεν αναχαιτίζεται εγκαίρως με αποτέλεσμα να συνεχίζεται ο πολλαπλασιασμός των βακίλων στο πνεύμονα οδηγώντας στην προοδευτική πρωτοπαθή λοίμωξη. Σε αυτή την περίπτωση εμφανίζονται βήχας, πυρετός, απώλεια βάρους, αιμόπτυση [89]. Αν η πρωτοπαθής λοίμωξη προσβάλλει και τον υπεζωκότα αναπτύσσεται μονόπλευρη φυματιώδης υπεζωκοτική συλλογή [94]. Τα άτομα αυτά μπορεί να εμφανίσουν οζώδες ερύθημα και φλυκταινώδη επιπεφυκίτιδα. Τα ακτινολογικά ευρήματα

της πρωτοπαθούς λοίμωξης διακρίνονται στις παρεγχυματικές πνευμονικές μεταβολές, στη λεμφαδενοπάθεια, στην υπεζωκοτική συλλογή και στην κεγχροειδή νόσο [95].α) η παρεγχυματική βλάβη χαρακτηρίζεται από ομοιογενείς, πυκνές, με δυσδιάκριτα όρια πυκνώσεις με επικράτηση κυρίως στο δεξιό πνεύμονα. Η ύπαρξη κοιλότητας είναι πιθανή αλλά σπάνια. Μια λοβαία κατανομή με μεγέθυνση του λοβού μπορεί να παρατηρηθεί. β) Μονόπλευρη πυλαία ή παρατραχειακή διόγκωση των λεμφαδένων με επικράτηση κυρίως δεξιά είναι συχνή και μπορεί να παρατηρηθεί καλύτερα με αξονική τομογραφία. γ) Η υπεζωκοτική συλλογή συχνά μπορεί να επισυμβεί σε απουσία παρεγχυματικής νόσου και είναι πιο συχνή στους ενήλικες από ότι στα παιδιά. δ) η κεγχροειδής φυματίωση χαρακτηρίζεται από πολλαπλές σκιάσεις διαμέτρου συνήθως 2-3 mm κατανεμημένες σε όλο το πνευμονικό παρέγχυμα και παρατηρείται καλύτερα στην αξονική τομογραφία.

Η μετά-πρωτοπαθής πνευμονική φυματίωση είναι υπεύθυνη για την πλειονότητα των κρουσμάτων μεταξύ ενηλίκων παγκοσμίως. Χωρίς θεραπεία εμφανίζει θνησιμότητα  $\geq 50\%$ . Το πιο συχνό σύμπτωμα είναι ο βήχας, αρχικά ξηρός, ερεθιστικός, που χειροτερεύει στην κατακεκλιμένη θέση. Σε προχωρημένη νόσο παρατηρούνται πτύελα, τα οποία μπορεί να είναι βλενώδη, βλεννοπυώδη, με στίγματα αίματος ή καθαρή αιμόπτυση. Μεγάλου όγκου αιμόπτυση είναι ασυνήθης επιπλοκή και παρατηρείται όταν υπάρχουν πνευμονικές κοιλότητες ή όταν αυτές έχουν αποικισθεί από *Aspergillus fumigatus*. Ο πυρετός αποτελεί ένα ακόμη σύμπτωμα, είναι χειρότερος τις απογευματινές ώρες και ακολουθείται από εφίδρωση μεγάλου όγκου. Σε προχωρημένη νόσο μπορεί να παρατηρηθεί απώλεια βάρους σχετιζόμενη με τον TNF. Οι ασθενείς είναι δυνατόν να χάσουν μέχρι και το 50% του αρχικού βάρους τους μέσα σε λίγους μήνες από την έναρξη της νόσου. Η ίνωση και η καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος με αποτέλεσμα την εμφάνιση έντονης δύσπνοιας παρατηρούνται σε προχωρημένα στάδια [96,97]. Ακτινολογικά η μετά-πρωτοπαθής φυματίωση χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη κατά τόπους πυκνώσεων στους κορυφαίους λοβούς ή στα κορυφαία τμήματα των κάτω λοβών μέχρι και την εκτεταμένη βρογχοπνευμονία. Η πυλαία ή παρατραχειακή λεμφαδενοπάθεια είναι σπάνιες. Η ανάπτυξη ίνωσης μπορεί να οδηγήσει σε μετατόπιση της τραχείας, λοβώδη ατελεκτασία, αντισταθμιστικό εμφύσημα και σχηματισμό φυματίδας. Η δημιουργία κοιλοτήτων παρατηρείται στο 40-80% των περιπτώσεων μετά-πρωτοπαθούς φυματίωσης. Το πάχος του τοιχώματος των κοιλοτήτων ποικίλλει και σπανίως μπορεί να εμφανίζουν υδραερικό επίπεδο. Σε 11% των κοιλοτήτων με διάμετρο μεγαλύτερη των 3cm μπορεί να επισυμβεί αποικισμός από μύκητες [98-100]. Το φυμάτωμα αποτελεί μια μάζα εντός κάψας, η οποία

στην ακτινογραφία μπορεί να φαίνεται σαν μονήρης όζος [95]. Τα ακτινολογικά χαρακτηριστικά της ενδοβρογχικής νόσου είναι η βρογχική στένωση, η μεταστενωτική διάταση, η εμμένουσα λοβώδης ατελεκτασία και οι οζώδεις σκιάσεις στο παρέγχυμα που ονομάζονται “tree in bud opacities” [101]. Σε ασθενείς με HIV και φυματίωση η ακτινολογική εικόνα ποικίλλει ανάλογα με την αμυντική ικανότητα του οργανισμού και μπορεί να έχει τα χαρακτηριστικά της μετά-πρωτοπαθούς νόσου ή της πρωτοπαθούς ή να είναι φυσιολογική [102].

### 1.8.2 Εξωπνευμονική φυματίωση

Αν και η πλειονότητα των περιπτώσεων ανήκουν στην πνευμονική φυματίωση παρατηρείται μια αύξηση των εξωπνευμονικών μορφών τόσο στις αναπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες για διάφορους λόγους, κυρίως λόγω της μετανάστευσης και της συνύπαρξης μόλυνσης από HIV και φυματίωση. Όργανα και συστήματα που μπορούν συχνότερα να μολυνθούν είναι οι λεμφαδένες, τα οστά και οι αρθρώσεις, το γαστρεντερικό σύστημα, το ουροποιογεννητικό, το κεντρικό νευρικό, το δέρμα, το περικάρδιο, το ήπαρ, το πάγκρεας, τα επινεφρίδια.

**Λεμφαδένες:** Το 90% των περιπτώσεων λεμφαδενικής φυματίωσης αφορά τους αυχενικούς λεμφαδένες και μόνο ένα μικρό ποσοστό τους μασχάλιαίους, τους γεννητικούς και του θωρακικού τοιχώματος (chest wall) [103]. Η λεμφαδενική διόγκωση είναι ανώδυνη και σταδιακή και σπάνια είναι επώδυνη. Οι λεμφαδένες είναι σκληροί και διακριτοί αν και στην πορεία της νόσου μπορεί να κλυδιάζουν λόγω της κεντρικής νέκρωσης. Η απουσία ερυθρήματος και θερμότητας χαρακτηρίζεται ως «ψυχρό απόστημα» (cold abscess). Η έλλειψη θεραπείας είναι δυνατόν να οδηγήσει στην εκροή υλικού δια μέσου του δέρματος.

**Οστά και αρθρώσεις:** Αυτή η μορφή φυματίωσης είναι δυνατόν να αναπτυχθεί 3-5 χρόνια μετά την αρχική πνευμονική λοίμωξη με προτίμηση την προσβολή της σπονδυλικής στήλης, η οποία αποτελεί το 50% των περιπτώσεων, και τα αναπτυσσόμενα άκρα των μακρών οστών [104]. Αρχικό σύμπτωμα αποτελεί ο πόνος στην σπονδυλική στήλη, ο οποίος μπορεί να προηγείται βδομάδες ή και μήνες της διάγνωσης. Τοπική ευαισθησία, ήπια κύφωση, ριζιτικός πόνος, κινητικά και αισθητικά συμπτώματα που αφορούν τα πόδια και τους σφικτήρες μπορούν να παρατηρηθούν. Τέλος, παρασπονδυλικά αποστήματα με τη μορφή παρασπονδυλικής μάζας ή αποστήματος στον ψοφίτη μυ επιπλέκουν αυτή τη μορφή φυματίωσης [105]. Στις αναπτυγμένες χώρες παρατηρείται αύξηση των περιστατικών φυματίωσης σε οποιοδήποτε οστό ή άρθρωση εκτός

σπονδυλικής στήλης με στροφή στις νεαρές ηλικίες και στους μετανάστες. Εμφανίζονται κυρίως με τη μορφή μονοαρθρίτιδας ή μεμονωμένης οστικής βλάβης [106,107].

**Γαστρεντερικό σύστημα:** Αυτή η μορφή φυματίωσης είναι σπάνια σε ιθαγενείς στις αναπτυγμένες χώρες αλλά συχνή στις αναπτυσσόμενες ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι του HIV. Μπορεί να μολυνθεί οποιοδήποτε τμήμα του γαστρεντερικού αν και η συμμετοχή του ανώτερου και περιπρωκτικού τμήματος είναι ασυνήθης [108]. Η πιο συχνή περιοχή προσβολής είναι η ειλεοτυφλική σε ποσοστό 25-80% [109]. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν γαστρικά και δωδεκαδακτυλικά έλκη, δυσφαγία, πυρετό, κοιλιακό πόνο, απώλεια βάρους, κόπωση, κοιλιακή διάταση λόγω ύπαρξης ασκίτη, ειλική ευαισθησία που μιμείται σκωληλοειδίτιδα ή ακόμα και ύπαρξη ειλικής μάζας. Η προσβολή του εντέρου με αποτέλεσμα την οξεία ή υποξεία απόφραξη του οδηγεί σε εμετούς, κοιλιακή διάταση ακόμα και στην ύπαρξη ψηλαφητής μάζας [110].

**Ουροποιογεννητικό σύστημα:** Αν και η συμμετοχή των νεφρών είναι συχνή τους πρώτους μήνες από την πρωτοπαθή λοίμωξη η κλινική λοίμωξη μπορεί να εμφανιστεί ακόμη και 20 χρόνια μετά καθώς ο οργανισμός θα παραμείνει σε λανθάνουσα κατάσταση στο νεφρικό παρέγχυμα. Ο πυρετός, η απώλεια βάρους και η νυχτερινή εφίδρωση δεν είναι συχνά κλινικά ευρήματα. Τα κυριότερα συμπτώματα είναι δυσουρία, αιματουρία, νυχτουρία, πρωτεϊνουρία, οσφυαλγία, υπέρταση, διάχυτη διάμεση νεφρίτιδα. Σπάνια παρατηρούνται νεφρική ανεπάρκεια ή αποφρακτική υδρονέφρωση ενώ η πλήρης απόφραξη των ουρητήρων μπορεί να οδηγήσει σε φυματιώδη πυονέφρωση. Η ανίχνευση άσηπτης πυουρίας είναι καθοριστικό εύρημα [111-114].

Η συμμετοχή του προστάτη, της επιδιδυμίδας και των όρχεων είναι πιο σπάνια [115].

Η φυματίωση του γυναικείου γεννητικού συστήματος είναι πιο συχνή στη Νότια Ασία. Η στειρότητα, πρωτοπαθής ή δευτερεύουσα, αποτελεί το πιο συχνό κλινικό εύρημα της προσβολής των σαλπίνγων και του ενδομητρίου. Η μητρορραγία και ο πυελικός πόνος παρατηρούνται στο 20-25% ενώ η αμηνόρροια και η μετεμηνόπαυσιακή αιμορραγία είναι πιο σπάνιες [116]. Η νόσος του αιδοίου είναι επίσης σπάνια και μιμείται τα σεξουαλικά μεταδιδόμενα νοσήματα [117].

**Κεντρικό νευρικό σύστημα:** Αν και η φυματίωση του κεντρικού νευρικού συστήματος αποτελεί μόνο το 5% των περιπτώσεων είναι πολύ σημαντική λόγω της αυξημένης θνητότητας που εμφανίζει. Η μηνιγγίτιδα αποτελεί την κυριότερη μορφή της νόσου ενώ μερικές φορές παρατηρούνται ενδοκράνια φυματιώματα και σπανιότερα εξωμηνιγγικά αποστήματα [107]. Τα αρχικά συμπτώματα είναι ανορεξία, κόπωση,

κεφαλαλγία, εμετός ενώ στα παιδιά παρατηρούνται ανορεξία, ευερεθιστότητα, υπνηλία, αλλαγή στη συμπεριφορά. Στη συνέχεια τα κλινικά ευρήματα περιλαμβάνουν πυρετό, ακαμψία αυχένα και στα βρέφη παρατηρούνται προέχουσες πηγές του κρανίου. Χοριοειδή φυμάτια μπορεί να συμβούν περιστασιακά, παραλύσεις κρανιακών νεύρων, κυρίως της τρίτης και έκτης εγκεφαλικής συζυγίας είναι πιο συχνά ενώ η μεσοπυρηνική οφθαλμοπληγία είναι πιο σπάνια αλλά καταδεικνύει χειρότερη πρόγνωση. Χοριοαθέτωση, ημιπάρεση, μονοπάρεση, μείωση ή απουσία εν τω βάθει τενόντιων αντανακλαστικών και επιληψία είναι δυνατόν να παρατηρηθούν.

**Δέρμα:** Η φυματίωση του δέρματος εμφανίζεται σε πολύ μικρό ποσοστό. Η πιο συχνή είναι το scrofuloderma, η οποία είναι η λοίμωξη του δέρματος από άμεση επέκταση από υποκείμενες δομές [120]. Στην πρωτοπαθή νόσο εμφανίζεται δερματική βλάβη στο σημείο ενοφθαλμισμού, η οποία στη συνέχεια εξελκώνεται καθώς και τοπική λεμφαδενοπάθεια. Άλλες μορφές αποτελούν η verrucosa cutis, με τη μορφή ακροχορδώνων και η verrucosa necrogenita, η οποία είναι πιο οξεία και επώδυνη. Στην κεγχροειδή φυματίωση παρατηρούνται εκτεταμένες, πολλαπλές βλατίδες. Ο λύκος ο συνήθης (Lupus vulgaris) αποτελεί μια συχνή μορφή της νόσου και χαρακτηρίζεται από βαθυκόκκινες ή ιόχρρες βλάβες κυρίως στα άνω και κάτω άκρα, στο πρόσωπο και στο κεφάλι. Αν προσβληθούν βαθύτεροι ιστοί, όπως ο χόνδρος των αυτιών και της μύτης, ως αποτέλεσμα μπορεί να έχουμε την παραμόρφωση [121]. Τέλος, είναι δυνατόν να παρατηρηθούν οζώδες ερύθημα (erythema nodosum), νόσος Bazin (erythema induratum ή Bazin's disease), βλατιδώδης και νεκροβλατιδώδης φυματίωση και άλλες μορφές υποδερματίτιδας.

**Περικάρδιο:** Στις αναπτυγμένες χώρες το ποσοστό των νοσημάτων του περικαρδίου που οφείλονται στη φυματίωση είναι 4-7% [122]. Στις αναπτυσσόμενες χώρες και ιδιαίτερα στην υποσαχάρια Αφρική αποτελεί σημαντική αιτία συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας [123]. Τα κυριότερα συμπτώματα της φυματιώδους περικαρδίτιδας είναι πυρετός, κόπωση, ιδρώτες, βήχας, οπισθοστερνική δυσφορία, απώλεια βάρους και ταχυκαρδία. Με την εμφάνιση περικαρδιακής συλλογής παρατηρούνται οιδήματα, παράδοξος σφυγμός, χαμηλή αρτηριακή πίεση, αυξημένη φλεβική πίεση. Σε περίπτωση επιπωματισμού η δύσπνοια είναι το κυριότερο εύρημα. Στο ΗΚΓ εμφανίζονται γενικευμένες αλλαγές στα Τ κύματα καθώς και χαμηλά δυναμικά. Η φυματιώδης περικαρδίτιδα μπορεί να εξελιχθεί και σε συμπιεστική περικαρδίτιδα, οπότε είναι δυνατόν να παρατηρηθούν οιδήματα, κοιλιακή διάταση, δύσπνοια, παράδοξος σφυγμός, χαμηλοί



καρδιακοί ήχοι, φλεβική πίεση που αυξάνεται με την εισπνοή (Kussmaul's sign) ενώ στο 50% των περιπτώσεων εμφανίζεται καρδιακή διόγκωση [124,125].

**Επινεφρίδια:** Η φυματίωση αποτελεί σπάνια αιτία επινεφριδιακής ανεπάρκειας στις αναπτυγμένες χώρες ενώ είναι πιο συχνή στις αναπτυσσόμενες. Τα επινεφρίδια σπάνια αποτελούν μεμονωμένη εστία και συχνά αυτή η μορφή της νόσου σχετίζεται με άλλες μορφές έξω-πνευμονικής φυματίωσης [126,127].

**Ήπαρ:** Το ήπαρ συνήθως προσβάλλεται στα πλαίσια της κεγχροειδούς φυματίωσης. Οζώδεις μορφές του ήπατος μπορεί να μιμηθούν την κίρρωση και το καρκίνωμα και να εμφανιστούν κλινικά ως πυλαία υπέρταση ή γαστρικοί κιρσοί [128-130]. Η διάγνωση βασίζεται στην εμφάνιση κοκκιωμάτων και βακίλων φυματίωσης στη βιοψία. Εντοπισμένα φυματιώδη αποστήματα έχουν επίσης περιγραφεί [131].

**Πάγκρεας:** Φυματιώδη προσβολή του παγκρέατος μπορεί να έχουμε είτε στα πλαίσια κεγχροειδούς φυματίωσης είτε να εμφανιστεί ως παγκρεατική μάζα με απώλεια βάρους και πυρετό [132].

**Κεγχροειδής φυματίωση:** Η κεγχροειδής φυματίωση συμβαίνει όταν οι βάκιλοι της φυματίωσης διασπείρονται οξέως μέσω της αιματικής ροής. Σε περιοχές με υψηλό επιπολασμό της νόσου η πλειονότητα των περιπτώσεων εμφανίζεται λίγο μετά την αρχική μόλυνση ενώ σε περιοχές με χαμηλό επιπολασμό οι περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζονται σε ηλικιωμένους αποτελώντας επανενεργοποίηση παλιάς λοίμωξης. Τα συμπτώματα είναι ύπουλα στην αρχή και περιλαμβάνουν ανορεξία, κόπωση, πυρετό και απώλεια βάρους [133]. Εκτός από τα παραπάνω γενικά συμπτώματα είναι δυνατόν να παρατηρηθούν κεφαλαλγία, βήχας, δύσπνοια και αιμόπτυση. Διόγκωση του ήπατος, του σπλήνα και των λεμφαδένων είναι λιγότερα συχνά. Μικρή περικαρδιακή ή υπεζωκοτική συλλογή ή ασκίτης είναι δυνατόν να παρατηρηθούν, όπως και δερματικές βλάβες με τη μορφή βλατίδων, κηλίδων ή πορφυρικών βλαβών. Βυθοσκόπηση των οφθαλμών είναι απαραίτητο να γίνει γιατί μπορεί να αποκαλύψει την ύπαρξη χαρακτηριστικών χοριοειδών φυματίων [134].

## 1.9 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

### A. Φαρμακευτική

#### A1. Φαρμακευτικά σκευάσματα

Η φαρμακευτική αντιμετώπιση της φυματίωσης έγινε για πρώτη φορά μετά την ανακάλυψη της στρεπτομυκίνης το 1944. Αργότερα ευρέθη ότι ο συνδυασμός στρεπτομυκίνης και παρα-αμινοσαλικυλικού οξέος απέτρεπε την ανάπτυξη φαρμακευτικής αντοχής και είχε καλύτερα αποτελέσματα [135]. Η ισονιαζίδη άρχισε να χρησιμοποιείται τις δεκαετίες 1950-60 [136]. Στις αρχές της δεκαετίας του 1960 προστέθηκαν στη φαρμακευτική φαρέτρα η πυραζιναμίδη, η εθειοναμίδη και η κυκλοσερίνη ενώ η ριφαμπικίνη ανακαλύφθηκε το 1965 [137].

Η **ισονιαζίδη** είναι ένα από τα δυο πιο σημαντικά φάρμακα εναντίον του *M tuberculosis* μαζί με τη ριφαμπικίνη. Παρουσιάζει την πιο έντονη βακτηριοκτόνο δράση. Σε αυτή είναι ευαίσθητα και τα *mycobacterium kansasii* και *mycobacterium xenopi*. Εμφανίζει καλή απορρόφηση από το γαστρεντερικό σύστημα και κατά την ενδομυϊκή χορήγηση [138]. Είναι προτιμότερο να χορηγείται με άδειο στομάχι ενώ τα αντιόξινα επιδρούν ποικιλοτρόπως στην απορρόφηση [139]. Η ισονιαζίδη κατανέμεται ευρέως στους περισσότερους ιστούς και ανθρώπινα υγρά, περνάει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ακόμα και σε έλλειψη φλεγμονής [140]. Διαπερνάει τον πλακούντα και εκκρίνεται στο μητρικό γάλα ενώ εισέρχεται στα μακροφάγα έχοντας ενδοκυττάρια δραστηριότητα. [141]. Η ισονιαζίδη μεταβολίζεται σε μεγάλο βαθμό κυρίως από το ήπαρ ενώ το 80% απεκκρίνεται με τα ούρα σαν αρχικό φάρμακο ή μεταβολίτης [138,141]. Οι κυριότερες παρενέργειες της ισονιαζίδης περιλαμβάνουν την υποκλινική ηπατίτιδα σε ποσοστό 10%, ενώ είναι δυνατόν να εμφανιστεί και κλινική εικόνα όμοια με ιογενούς ηπατίτιδας (ανορεξία, ναυτία, έμετοι, κοιλιακός πόνος, απώλεια βάρους). Εργαστηριακά είναι δυνατόν να παρατηρηθεί άνοδος των τιμών των SGOT, SGPT και χολερυθρίνης. Η συχνότητα της ηπατοτοξικότητας μειώνεται στις μικρές ηλικίες. Σε ηλικίες 35-49 ετών είναι περίπου 1.2%, σε ασθενείς 20-34 ετών είναι 0.3% ενώ σε άτομα κάτω των 20 ετών είναι περίπου 0%. Ελάχιστες περιπτώσεις είναι δυνατόν να εξελιχθούν σε εκτεταμένη ηπατική νέκρωση και θάνατο. Οι περιπτώσεις αυτές είναι περίπου 0.08% των συνολικών περιπτώσεων που λαμβάνουν ισονιαζίδη είτε προφυλακτικώς είτε θεραπευτικώς. Άλλες αναφερόμενες παρενέργειες είναι αρθραλγίες, φαρμακευτικό σύνδρομο λύκου, νευροπάθειες. Σε υπερβολική

δοσολογία μπορεί να προκαλέσει ψύχωση, ευφορία, υπνηλία, κόμα, σπασμούς ή και θάνατο [138,140,142].

Η **ριφαμπικίνη** έχει βακτηριοκτόνο δράση εναντίον του *M tuberculosis* αλλά και άλλων ειδών όπως των *M bovis* και *M kansasii* [143]. Πρέπει να χορηγείται με άδειο στομάχι ενώ τα αντιόξινα και η ρανιτιδίνη επηρεάζουν ελάχιστα την απορρόφηση της [144]. Ορισμένοι ασθενείς με διαβήτη, κυστική ίνωση, HIV και χειρουργείο στο γαστρεντερικό σύστημα μπορεί να παρουσιάζουν καθυστερημένη ή μειωμένη απορρόφηση [144]. Η διείσδυση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ποικίλλει και είναι πιο έντονη με φλεγμαίνουσες μήνιγγες. Η ριφαμπικίνη μεταβολίζεται από εντερικές και ηπατικές εστεράσες, εκκρίνεται στη χολή και αποβάλλεται με τα κόπρανα. Το 10% αποβάλλεται αναλλοίωτη με τα ούρα [144,145]. Στις παρενέργειες συγκαταλέγονται ηπατοτοξικότητα, αιμολυτική αναιμία, θρομβοκυτοπενία, οξεία νεφρική ανεπάρκεια και σύνδρομο ομοιάζον τη γρίπη [143].

Η **ριφαμπουτίνη** διατηρεί την δραστικότητα της ριφαμπικίνης εναντίον του *M tuberculosis* ενώ εμφανίζει ανωτερότητα εναντίον του *m avium complex* [146]. Η διείσδυση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ποικίλλει (30-70%), ενώ η επίδραση του φαγητού στην απορρόφηση της είναι ήπια. Μεταβολίζεται στο έντερο και στο ήπαρ και σε ποσοστό λιγότερο από 10% εκκρίνεται αμεταβόλιστο από τα ούρα. Οι κυριότερες παρενέργειες περιλαμβάνουν αρθραλγίες, πρόσθια ραγοειδίτιδα, αποχρωματισμός του δέρματος και λευκοπενία [140,143].

Η **πυραζιναμίδη** εμφανίζει μικροβιοστατική δράση *in vitro* ενώ παρουσιάζει μικροβιοκτόνο δράση μόνο στα ενδοκυττάρια μυκοβακτηρίδια και σε όξινο pH. Είναι δραστική μόνο έναντι του *m tuberculosis* και του *m africanum*. Γενικά παρουσιάζει καλή απορρόφηση στους ενήλικες αν και υπάρχουν αναφορές για μη καλή απορρόφηση στα παιδιά και σε ασθενείς με HIV [147,148]. Οι παρενέργειες της πυραζιναμίδης είναι ενοχλήματα από το γαστρεντερικό σύστημα, αρθραλγίες και αύξηση του ουρικού οξέος στο αίμα. Επίσης έχει συσχετιστεί με ένα απρόσμενο αριθμό σοβαρών ηπατικών βλαβών όταν χορηγείται καθημερινά με ριφαμπικίνη στη θεραπεία της λανθάνουσας φυματίωσης [149].

Η **εθαμβουτόλη** είναι βακτηριοστατικό και δρα εναντίον των *m tuberculosis*, *m bovis*, *m kansasii*, *m intracellulare* και *m avium*. Η απορρόφηση της δεν επηρεάζεται σημαντικά από το φαγητό αλλά πρέπει να αποφεύγεται η ταυτόχρονη χορήγηση αντιοξινών [150]. Η διείσδυση του αιματοεγκεφαλικού φραγμού ποικίλλει και συνήθως

είναι φτωχή (5%). Αποβάλλεται τόσο από το ήπαρ όσο και από τα νεφρά [151]. Η οπτική νευρίτιδα και κυρίως η οπισθοβολβική νευροπάθεια είναι η πιο σημαντική παρενέργεια. Άλλες παρενέργειες είναι η αύξηση του ουρικού οξέος στο πλάσμα, χολοστατικός ίκτερος, διάμεση νεφρίτιδα, θρομβοκυτοπενία, λευκοπενία και δερματικές αντιδράσεις.

Το **παρα-αμινοσαλικυλικό οξύ** δεν είναι βακτηριοκτόνο και δρα κυρίως αν όχι αποκλειστικά έναντι της εξωκυττάριας φυματίωσης. Είναι ενεργό έναντι των *m tuberculosis* και *m bovis*. Απορροφάται καλά από το γαστρεντερικό σύστημα όπου γίνεται και ο μεταβολισμός του μαζί με το ήπαρ. Οι διάρροιες αποτελούν σημαντική παρενέργεια ενώ μπορεί να παρατηρηθεί στεατόρροια και δυσαπορρόφηση βιταμίνης B12, φυλλικού οξέος και σιδήρου. Αντιδράσεις υπερευαισθησίας με εμφάνιση πυρετού και εξανθήματος είναι συχνές. Λιγότερα συχνά εμφανίζονται αγγειίτιδες, αρθραλγίες, ηωσινοφιλία, λευκοπενία, θρομβοπενία, ηπατίτιδα και ένα σύνδρομο που ομοιάζει με λέμφωμα. Το παρα-αμινοσαλικυλικό είναι γνωστό ότι μπορεί να προκαλέσει βρογχοκήλη με ή χωρίς μυξοίδημα [152].

Η **κυκλοσερίνη** είναι βακτηριοστατική με παρόμοια δράση εναντίον των *m tuberculosis*, *m kansasii*, *m. Intracellulare* και *m. Avium*. Η απορρόφηση είναι καλή όταν χορηγείται από το στόμα αν και μειώνεται ή καθυστερεί με την ύπαρξη φαγητού. Διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και 30-90% της δόσης του φαρμάκου εμφανίζεται στα ούρα μέσα σε 24 ώρες [151,153]. Η κυριότερη παρενέργεια είναι η τοξικότητα του κεντρικού νευρικού συστήματος που περιλαμβάνει υπερ-ευερεθιστότητα, ζάλη, λήθαργο, κατάθλιψη, απώλεια μνήμης και πολύ σπάνια τοπική ή *grand-mal* επιληψία [152]. Άλλες σπάνιες ανεπιθύμητες ενέργειες είναι η διαταραχή του γαστρεντερικού συστήματος, η εμφάνιση εξανθημάτων και οι καρδιακές αρρυθμίες [151,152].

Η **εθειοναμίδη** είναι ενεργή εναντίον ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων μυκοβακτηριδίων στα μονοκύτταρα. Είναι χρήσιμη εναντίον των *m. tuberculosis*, *m. avium* και *m. leprae*. Διανέμεται σε όλο το σώμα ενώ η συγκέντρωση στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό πλησιάζει αυτή του πλάσματος. Η εθειοναμίδη περνάει άμεσα τον πλακούντα [154]. Οι κυριότερες παρενέργειες της είναι ναυτία, εμετός, οπτικές διαταραχές, περιφερειακή νευρίτιδα, βρογχοκήλη με ή χωρίς υποθυρεοειδισμό. Οι γυναικομαστία, αλωπεκία, ανικανότητα, φωτοδερματίτιδα, ακμή και αρθρίτιδα συμπληρώνουν τη λίστα με τις ανεπιθύμητες ενέργειες [154].

Οι **αμινογλυκοσίδες** που χρησιμοποιούνται εναντίον της φυματίωσης είναι η αμικασίνη, η καναμυκίνη και η στρεπτομυκίνη. Η ωτοτοξικότητα και η νεφροτοξικότητα είναι οι πιο σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Ο περιοδικός έλεγχος της ουρίας, της κρεατινίνης, του ασβεστίου, του καλίου και του μαγνησίου του πλάσματος είναι σημαντικός. Πιο σπάνιες τοξικότητες περιλαμβάνουν την ηωσινοφιλία, δερματικά εξανθήματα και φαρμακευτικός πυρετός [155].

Από τις **φλουοροκινολόνες** η σιπροφλοξασίνη, η οφλοξασίνη, η λεβοφλοξασίνη, η γκατιφλοξασίνη και η μοξιφλοξασίνη είναι οι πιο ενεργές εναντίον της φυματίωσης. Είναι βακτηριοκτόνες [156]. Διαπερνούν τον πλακούντα και περνούν και στο μητρικό γάλα ενώ η συγκέντρωση της οφλοξασίνης στις φλεγμαινούσες μήνιγγες φτάνει το 40-90% της συγκέντρωσης στο πλάσμα. Οι κυριότερες ανεπιθύμητες ενέργειες προέρχονται από το γαστρεντερικό και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Η γκατιφλοξασίνη είναι πιο επιρρεπής στην πρόκληση υπο- ή υπέρ-γλυκαιμίας [157].

Ενδιαφέρον είναι να δούμε ορισμένα νέα φάρμακα που βρίσκονται ακόμα υπό δοκιμή. Το diarylquinoline R207910 (γνωστό και ως TMC207) βρίσκεται στο δεύτερο κλινικό στάδιο δοκιμής (clinical phase II testing). Είναι εξίσου ενεργό έναντι ευαίσθητων και ανθεκτικών βακίλων φυματίωσης. Ο κύριος στόχος είναι η χρήση αυτού του φαρμάκου στη MDR- TB [158]. Το PA-824 είναι ένα nitroimidazopyran, το οποίο μαζί με τη μοξιφλοξασίνη και τη πυραζιναμίδα είναι δυνατόν να αποτελέσουν ένα χρήσιμο θεραπευτικό σχήμα για την MDR- TB. Σύντομα θα μπει στο δεύτερο κλινικό στάδιο δοκιμής [159]. Το OPC-67683 είναι ένα συνθετικά κατασκευασμένο nitro-dihydroimidazo-oxazole, το οποίο βρίσκεται ήδη στο δεύτερο κλινικό στάδιο δοκιμής [160]. Τέλος το SQ109 παρουσιάζει έναν μοναδικό μηχανισμό έναντι του μυκοβακτηριδιακού τοιχώματος και φαίνεται να είναι βακτηριοκτόνο [158]. Το φάρμακο αυτό έχει εισέλθει στο πρώτο κλινικό στάδιο δοκιμής [161].

## A2. Θεραπευτικά σχήματα

Οι στόχοι της φαρμακευτικής αντιμετώπισης της φυματίωσης είναι οι παρακάτω: η ίαση των ασθενών με φυματίωση με τη μικρότερη χρονικά δυνατή αγωγή, η αποτροπή θανάτων από φυματίωση, η πρόληψη υποτροπής της νόσου, η παρεμπόδιση εμφάνισης φαρμακευτικής αντοχής και η μείωση της μετάδοσης της νόσου σε υγιείς μέσα στην κοινότητα.

Για την καλύτερη φαρμακευτική αντιμετώπιση κατηγοριοποιήσαμε θεραπευτικά τις περιπτώσεις φυματίωσης ως εξής:

Κατηγορία I: Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι νέες περιπτώσεις φυματίωσης με θετική την απλή εξέταση πτυέλων ή με αρνητική την εξέταση αλλά εκτεταμένη παρεγχυματική προσβολή καθώς και οι ασθενείς με σοβαρή έξω-πνευμονική νόσο (φυματιώδης μηνιγγίτιδα, περικαρδίτιδα, περιτονίτιδα, κεγχροειδής φυματίωση, φυματίωση του ουροποιογεννητικού, του εντέρου, της σπονδυλικής στήλης και αμφοτερόπλευρη ή μεγάλη υπεζωκοτική συλλογή).

Κατηγορία II: Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται οι ασθενείς με υποτροπή (θεραπεύτηκαν πλήρως στο παρελθόν και επανεμφανίζουν θετική απλή εξέταση πτυέλων για B-Koch), με θεραπευτική αποτυχία (5 μήνες μετά την έναρξη αγωγής παρουσιάζουν θετική την απλή εξέταση πτυέλων ή ενώ αρχικά η εξέταση ήταν αρνητική 2 μήνες μετά την έναρξη αγωγής είναι θετική) και οι ασθενείς μετά από διακοπή της αγωγής (διακοπή για τουλάχιστον 2 μήνες και έχουν θετική την απλή εξέταση ή αρνητική την εξέταση αλλά ενεργή μορφή της νόσου).

Κατηγορία III: Στην τρίτη κατηγορία εντάσσονται οι νέες περιπτώσεις με αρνητική εξέταση πτυέλων και περιορισμένη παρεγχυματική βλάβη ή μη σοβαρή μορφή έξω-πνευμονικής φυματίωσης (λεμφαδενίτιδα, μικρή ως μέτρια μονόπλευρη υπεζωκοτική συλλογή, φυματίωση οστών, αρθρώσεων και δέρματος).

Κατηγορία IV: περιλαμβάνονται οι περιπτώσεις χρόνιας φυματίωσης [162].

Σύμφωνα με τις οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας και της International Union Against Tuberculosis and Lung Disease τα θεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται στις διάφορες θεραπευτικές κατηγορίες παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα 8:

Πίνακας 8. Θεραπευτικά σχήματα

Θεραπευτική κατηγορία	Θεραπευτικά σχήματα
I	2EHRZ/4HR 2SHRZ/4HR Όταν υπάρχει δυνατότητα διακεκομμένης θεραπείας 2EHRZ/4H <sub>3</sub> R <sub>3</sub> 2SHRZ/4H <sub>3</sub> R <sub>3</sub> 2E <sub>3</sub> H <sub>3</sub> R <sub>3</sub> Z <sub>3</sub> /4H <sub>3</sub> R <sub>3</sub> 2S <sub>3</sub> H <sub>3</sub> R <sub>3</sub> Z <sub>3</sub> /4H <sub>3</sub> R <sub>3</sub> 2SHRZ/4H <sub>2</sub> R <sub>2</sub> Σχήματα μεγαλύτερης διάρκειας 2EHRZ/6HE 2SHRZ/6HE 2EHRZ/6HT 2SHRZ/6HT 2EHR/7HR 2SHR/7HR 9HR
II	2SHRZE/1 HRZE/5HRE 2SHRZE/1 HRZE/5H <sub>3</sub> R <sub>3</sub> E <sub>3</sub>
III	2HRZ/4HR 2HRZ/6HE 2HRZ/4H <sub>3</sub> R <sub>3</sub>
IV	Παραπομπή σε πνευμονολογική κλινική

S: στρεπτομυκίνη, E: εθαμβουτόλη, H: ισονιαζίδη, R:ριφαμπικίνη, P: πυραζιναμίδα, T: θειακεταζόνη, X: καθημερινά, X<sub>3</sub>: τρεις φορές την εβδομάδα (Πίνακας από: PDO Davies, PF Barnes, SB Gordon. Clinical tuberculosis, Fourth Edition)

Η χρήση δισκίων που περιέχουν δύο, τρία ή και τέσσερα φάρμακα ταυτόχρονα (fixed dose drug combination tablets) μπορεί να διευκολύνει τη συνταγογράφηση των φαρμάκων και την προμήθεια, να μειώσει τα ιατρικά λάθη, να ενισχύσει τη συμμόρφωση των ασθενών στη θεραπεία και να μειώσει την ανάπτυξη πολυανθεκτικής φυματίωσης [163]. Η πλειονότητα των μελετών δεν έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των συνδυασμένων και των ξεχωριστών φαρμάκων όσον αφορά στα ποσοστά μεταστροφής των θετικών καλλιιεργειών πτυέλων και στη συχνότητα των ανεπιθύμητων ενεργειών και των υποτροπών της νόσου [164].

Οι συνηθισμένες δοσολογίες των αντιφυματικών φαρμάκων φαίνονται στον πίνακα 9:



Πίνακας 9. Δοσολογίες αντιφυματικών φαρμάκων

Φάρμακο	Καθημερινή δοσολογία			Διακοπτόμενη	
	Ενήλικες&παιδιά (mg/kg)	ενήλικες		3φορές/εβδομάδα (mg/kg)	2φορές/εβδομάδα
		Βάρος(kg)	Δοσολογία		
Ισονιαζίδη	5		300mg	10	15
Ριφαμπικίνη	10	<50	450mg	10-12	10-12
		≥ 50	600mg		
Στρεπτομυκίνη	12-15	<50	500mg	12-15	12-15
		≥ 50	750mg		
Πυραζιναμίδη	20-30	<50	1-1.5g	30-40	40-60
		≥ 50	1.5-2g		
Εθαμβουτόλη	15			30	45
Θειακεταζόνη	2.5		150mg		
Αμικασίνη	15		750mg		
Καναμυκίνη	15		750mg		
Καπρομυκίνη	15		750mg		
Οφλοξασίνη			600-800mg		
Λεβοφλοξασίνη			500-600mg		
Σπροφλοξασίνη			750-1500mg		
Εθειοναμίδη	15	<50	500mg		
Κυκλοσερίνη	15	<50	500mg		
		≥ 50	750mg		
Παρ-αμινοσαλικυλικό	2g/10kg	<50	8-10g		
		≥ 50	10-12g		

(Πίνακας από: PDO Davies, PF Barnes, SB Gordon. Clinical tuberculosis, Fourth Edition)

### A3. Θεραπευτική προσέγγιση σε ειδικές συνθήκες

Υπάρχουν ορισμένες καταστάσεις όπου η θεραπευτική προσέγγιση της φυματίωσης πρέπει να προσαρμοστεί στις ειδικές συνθήκες:

**Κύηση και λοχεία:** Οι ισονιαζίδη, εθαμβουτόλη, πυραζιναμίδη και ριφαμπικίνη χρησιμοποιούνται στα περισσότερα μέρη του κόσμου για την αντιμετώπιση της φυματίωσης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης αν και οι κατασκευαστές συνιστούν προσοχή όσον αφορά στη ριφαμπικίνη. Οι φλουοροκινολόνες και η στρεπτομυκίνη απαγορεύονται. Υποθεραπευτικές δόσεις των φαρμάκων περνούν στο μητρικό γάλα, οπότε η γαλουχία δεν αποτελεί απόλυτη αντένδειξη [162,164,165].

**Ηλικιωμένοι:** Σε γενικές γραμμές η θεραπεία στους ηλικιωμένους δε διαφέρει σε σχέση με τον νεανικό πληθυσμό. Λόγω της αυξημένης πιθανότητας εμφάνισης ηπατοτοξικότητας, κυρίως στους υποσιτιζόμενους ηλικιωμένους, συνίσταται η μείωση της δοσολογίας και η χορήγηση πυριδοξίνης σε αυτούς που δεν σιτίζονται επαρκώς ή εμφανίζουν μεγάλη πιθανότητα εμφάνισης νευροπάθειας. Στα ηλικιωμένα άτομα με προβληματική όραση η χρήση της εθαμβουτόλης μπορεί να είναι προβληματική [166].

**Ηπατική δυσλειτουργία:** Παροδικές μεταβολές στα ηπατικά ένζυμα και στη χολερυθρίνη παρατηρούνται αρκετά συχνά κατά τη διάρκεια της θεραπείας ενώ έχει σημειωθεί και εμφάνιση ηπατοτοξικότητας με αποτέλεσμα θανάτους εξαιτίας κεραυνοβόλου ηπατικής νέκρωσης [167]. Ασθενείς με υποκείμενα νοσήματα όπως ηπατίτιδα Β και C, HIV, μακροχρόνια χρήση αλκοόλ, κακή σίτιση, μεγάλη ηλικία είναι πιο επιρρεπείς στην εμφάνιση ηπατοτοξικότητας [168-171]. Όταν η νόσος είναι ήπια ή έχει εμφανιστεί ουσιαστική βελτίωση μετά την έναρξη της θεραπείας και πριν την εμφάνιση ηπατοτοξικότητας λόγω των χορηγούμενων φαρμάκων υπάρχει η δυνατότητα διακοπής των φαρμάκων μέχρι τα ηπατικά ένζυμα να επανέλθουν σε φυσιολογικές τιμές. Αν και η συγχορήγηση ισονιαζίδης και ριφαμπικίνης πιθανόν αυξάνει τον κίνδυνο ηπατοτοξικότητας η παρουσία τους στο αρχικό θεραπευτικό σχήμα είναι αναγκαία όπου είναι δυνατόν [172]. Ένα άλλο θεραπευτικό σχήμα περιλαμβάνει τη χορήγηση στρεπτομυκίνης, εθαμβουτόλης και ισονιαζίδης ακολουθούμενο από ισονιαζίδη και εθαμβουτόλη. Τέλος, όταν η νόσος είναι προχωρημένη και καθυστέρηση στη θεραπεία μπορεί να είναι επιβλαβής μπορεί να χορηγηθεί οφλοξασίνη, στρεπτομυκίνη και εθαμβουτόλη ως ενδιάμεση προσωρινή αγωγή [173].

**Νεφρική δυσλειτουργία:** Στη νεφρική δυσλειτουργία σε γενικές γραμμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν η ισονιαζίδη, η ριφαμπικίνη και η πυραζιναμίδη με την κανονική

δοσολογία, η τελευταία τρεις φορές εβδομαδιαίως [162,164,165]. Η στρεπτομυκίνη και οι αμινογλυκοσίδες πρέπει να αποφεύγονται ή πρέπει να προσαρμόζονται οι δοσολογίες. Προσαρμογή στη δοσολογία επιβάλλεται στην εθαμβουτόλη, στην οφλοξασίνη και στη σιπροφλοξασίνη. Σε άτομα που εφαρμόζουν αιμοδιάλυση ή χορήγηση ισονιαζίδης και ριφαμπικίνης γίνεται χωρίς καμία μετατροπή. Ο κύριος μεταβολίτης της πυραζιναμίδης συσσωρεύεται στους νεφροπαθείς για αυτό η απομάκρυνση του με την αιμοδιάλυση θεωρείται σημαντική όπως και η πιθανή μείωση της δόσης της πυραζιναμίδης [174]. Η εθαμβουτόλη συνίσταται να χορηγείται σε δόση 15mg/kg τρεις φορές εβδομαδιαίως. Όσον αφορά στο χρόνο χορήγησης των φαρμάκων άλλες αρχές συνιστούν τη χορήγηση 6-24 ώρες πριν την αιμοδιάλυση [175] και άλλες μετά την αιμοδιάλυση [174].

**Πυριτίαση:** Είναι γνωστό ότι οι ασθενείς με πυριτίαση βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης ενεργού φυματίωσης και η θεραπεία τους είναι πιο δύσκολη λόγω της μειωμένης λειτουργικότητας των κυψελιδικών μακροφάγων και της μειωμένης διεισδυτικότητας των φαρμάκων στους ινωτικούς ιστούς. Μια έρευνα για ασθενείς με πυριτίαση που έλαβε χώρα στην Ταϊβάν έδειξε ότι 9μηνο σχήμα που αποτελείται από ισονιαζίδη, ριφαμπικίνη, πυραζιναμίδη και στρεπτομυκίνη για 2 μήνες ακολουθούμενα από ισονιαζίδη και ριφαμπικίνη για 7 μήνες είχε επιτυχία σε ποσοστό 95% και ποσοστό υποτροπής 5% σε περίοδο παρακολούθησης 18-40 μήνες [176].

**Ασθενείς με HIV:** Οι πρόσφατες οδηγίες του Centers for Disease Control and Prevention (CDC) για τους ασθενείς με HIV συνιστούν τη χορήγηση του τυπικού χημειοθεραπευτικού σχήματος για το ελάχιστο 6 μήνες, αλλά σε περίπτωση που η κλινική ή βακτηριολογική απάντηση είναι αργή η θεραπεία πρέπει να χορηγηθεί συνολικά για 9 μήνες ή τουλάχιστον για 4 μήνες μετά την επίτευξη της αρνητικοποίησης των πτυέλων [177]. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της ριφαμπικίνης ή της ριφαμπουτίνης με τους αναστολείς HIV πρωτεασών (HIV protease inhibitors) και τους non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors απαιτεί συχνά την προσαρμογή των δόσεων [167]. Για να υπερφαλαγγίσει αυτό το πρόβλημα το CDC έχει προτείνει τη χορήγηση ισονιαζίδης, πυραζιναμίδης και στρεπτομυκίνης για 9 μήνες και εθαμβουτόλης για τους 2 πρώτους μήνες. Υπάρχει, όμως, ανησυχία για την αποτελεσματικότητα του παραπάνω σχήματος [178].

**Ασθενείς με μονοανθεκτική πνευμονική φυματίωση:** Σε ασθενείς με ανθεκτικότητα στην ισονιαζίδη υπάρχουν δυο δυνατές προσεγγίσεις αν δεν έχουμε τα αποτελέσματα ευαισθησίας πριν την έναρξη θεραπείας: Α) συνέχιση της ριφαμπικίνης,

εθαμβουτόλης και πυραζιναμίδης για άλλους 10 μήνες ή χορήγηση ριφαμπικίνης και εθαμβουτόλης για 12 μήνες αφού έχουν χορηγηθεί ριφαμπικίνη, ισονιαζίδη, εθαμβουτόλη και πυραζιναμίδη για 2 μήνες πριν τη λήψη των αποτελεσμάτων ευαισθησίας [165].B) δίνεται το αρχικό τετραπλό σχήμα για 6 μήνες [179]. Αν γνωρίζουμε από τη αρχή της θεραπείας την ανθεκτικότητα στην ισονιαζίδη χορηγούμε στρεπτομυκίνη, πυραζιναμίδη, ριφαμπικίνη και εθαμβουτόλη για 2 μήνες και στη συνέχεια ριφαμπικίνη και εθαμβουτόλη για 7 μήνες [180].

Σε ανθεκτική στη ριφαμπικίνη φυματίωση χορηγούμε ισονιαζίδη, εθαμβουτόλη και πυραζιναμίδη για 18-24 μήνες [181] ή με προσθήκη στο παραπάνω τριπλό σχήμα φλουοροκινολόνης η χορήγηση μειώνεται στους 9-12 μήνες [182].

**Ασθενείς με πολυανθεκτική φυματίωση:** Πολυανθεκτική φυματίωση (multidrug-resistant) ορίζεται ως η φυματίωση η ανθεκτική σε τουλάχιστον δύο φάρμακα πρώτης γραμμής (ισονιαζίδη, ριφαμπικίνη). Ο WHO έχει προτείνει την εφαρμογή του DOTS προκειμένου να αντιμετωπιστεί αυτή η απειλή [183], ενώ η εφαρμογή του DOTS-Plus περιλαμβάνει και την προσεκτική χορήγηση φαρμάκων δεύτερης γραμμής μετά από αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και του κόστους τους [184]. Ένα θεραπευτικό σχήμα που έχει προτείνει ο WHO για την αντιμετώπιση της πολυανθεκτικής φυματίωσης περιλαμβάνει τη χορήγηση εθαμβουτόλης, εθειοναμίδης/προθειοναμίδης, οφλοξασίνης/σιπροφλοξασίνης, πυραζιναμίδης και αμινογλυκοσίδης για 6 μήνες με τα τρία ή τέσσερα πρώτα να χορηγούνται για περαιτέρω 18 μήνες τουλάχιστον [185]. Προκαταρκτικά στοιχεία από τρεις έρευνες δείχνουν ότι πιθανόν η λεβοφλοξασίνη έχει καλύτερη δραστηριότητα από την οφλοξασίνη [186]. Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει έρευνες για το κατά πόσο μπορεί η ανοσοθεραπεία να βοηθήσει στην αντιμετώπιση της πολυανθεκτικής φυματίωσης. Βοηθητική ανοσοθεραπεία με ανασυνδυασμένη ανθρώπινη IL-2 (recombinant human IL-2) πιθανόν να έχει αντιμικροβιακή δράση [187]. Μια έρευνα κατέδειξε ότι η εισπνεόμενη IFN-α μπορεί να μειώσει τις αποικίες των βακίλων στις καλλιέργειες πτυέλων [188]. Εκθέσεις προτείνουν ότι η χορήγηση IFN- γ μπορεί να μειώσει το φορτίο των βακίλων σε ασθενείς με MDR-TB [189]. Προκαταρκτικές πληροφορίες που αφορούν τη χρήση heat-killed *Mycobacterium vaccae* πιθανολογούν την αποτελεσματικότητα του [190].

Τον Σεπτέμβριο του 2006 ο WHO εξέφρασε ανησυχία για την εμφάνιση μιας λοιμογόνου πολυανθεκτικής μορφής φυματίωσης που αναφέρεται ως «εκτεταμένα πολυανθεκτική φυματίωση» (extensively drug-resistant tuberculosis / XDR-TB). Ως XDR-

TB ορίζεται η φυματίωση η ανθεκτική τουλάχιστον στην ισονιαζίδη και στη ριφαμπικίνη όσον αφορά στα φάρμακα πρώτης γραμμής και όσον αφορά στις δεύτερης γραμμής σε οποιαδήποτε φλουοροκινολόνη και σε τουλάχιστον ένα από τα τρία ενέσιμα φάρμακα (καπρεομυκίνη, καναμυκίνη, αμικασίνη) [191]. Η θεραπευτική αντιμετώπιση της XDR-TBC είναι δύσκολη απαιτώντας συνήθως τη χρήση τουλάχιστον τεσσάρων έως έξι δευτερευόντων φαρμάκων στα οποία υπάρχει ευαισθησία για τουλάχιστον 18-24 μήνες. Το ποσοστό θεραπευτικής επιτυχίας είναι χαμηλό (30-50%) ιδιαίτερα στους ασθενείς με HIV [192]. Νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι η χρήση της λινεζολίδης μπορεί να αυξήσει τις πιθανότητες αρνητικοποίησης των πτυέλων στην XDR-TB και στη MDR-TB. Έρευνες τονίζουν ότι λόγω των σοβαρών παρενεργειών που προκαλεί είναι καλύτερο να χρησιμοποιείται μόνο σε επιλεγμένες περιπτώσεις όταν δεν υπάρχουν άλλες φαρμακευτικές εναλλακτικές λύσεις [193]. Αν και υπάρχουν λίγα δεδομένα η χειρουργική αντιμετώπιση μπορεί να αποτελεί ένα χρήσιμο συμπληρωματικό θεραπευτικό μέσο για την XDR-TBC [194].

#### 1.9B Χειρουργική θεραπευτική αντιμετώπιση

Οι χειρουργικές τεχνικές πνευμονικής εκτομής που χρησιμοποιούνται σήμερα αναπτύχθηκαν για την αντιμετώπιση της φυματίωσης τις δεκαετίες του '30, '40 και του '50. Σήμερα η φυματίωση επωφελείται από την ανάπτυξη νεότερων τεχνικών όπως η βίντεο-μεσοθωρακοσκόπηση, η VATS και η μυοπλαστική. Οι κυριότερες ενδείξεις για χειρουργική αντιμετώπιση της φυματίωσης είναι η πολυανθεκτική φυματίωση(MDR-TBC) ενώ υπάρχουν στοιχεία ότι μπορεί να διαδραματίσει θετικό ρόλο και στην εκτεταμένα πολυανθεκτική φυματίωση (XDR-TB), επιπλοκές όπως η εμφάνιση αιμόπτυσης, ασπεργιλώματος, φυματίωσης του τραχειοβρογχικού δέντρου ή των μεσοθωρακικών και των πυλαίων λεμφαδένων, βρογχεκτασιών και βρογχοπνευμονικού συριγγίου [195,196].

Στις περιπτώσεις των MDR και XDR-TB η χειρουργική θεραπεία παίζει συμπληρωματικό ρόλο στη φαρμακευτική. Οι ασθενείς, των οποίων τα πτύελα δεν αρνητικοποιούνται και στους οποίους υπάρχουν υπολειμματικές κοιλότητες ή κατεστραμμένο πνευμονικό παρέγχυμα, επιλέγονται για χειρουργική αντιμετώπιση εφόσον η νόσος τους μπορεί να περιχαρακωθεί με την εκτομή [197].

Η αιμόπτυση μπορεί να είναι μικρή και επαναλαμβανόμενη ή μεγάλη και επικίνδυνη για τη ζωή. Μπορεί να είναι αποτέλεσμα ύπαρξης βρογχεκτασιών, κατεστραμμένου

παρεγχύματος ή μη επιλεγμένης κοιλότητας. Η χειρουργική αντιμετώπιση ενδείκνυται μόνο όταν τα συμπτώματα είναι σοβαρά λόγω του αυξημένου κινδύνου.

Στην περίπτωση του ασπεργιλλώματος υπάρχει η δυνατότητα του εμβολισμού του βρογχικού αγγείου που αιμορραγεί ή της συμβατικής χειρουργικής εκτομής της επικρατούσας βλάβης. Στους ασθενείς, στους οποίους έχει επανειλημμένως αποτύχει ο εμβολισμός ή είναι ακατάλληλοι για συμβατικό χειρουργείο, έχει προταθεί η ένεση αντιμυκητιασικών ουσιών ('polish paste', natamycin, brilliant green) μέσα στην κοιλότητα βρογχοσκοπικά ή διαδερμικά με μη πειστικά αποτελέσματα [198]. Μια άλλη μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί είναι η σπηραγγοστομία (cavernostomy).

Η ενδοβρογχική φυματίωση μπορεί να προκαλέσει βρογχική στένωση και καταστροφή του πνευμονικού παρεγχύματος. Για αυτό το λόγο όταν δεν αντιμετωπίζεται με τη φαρμακευτική αγωγή και τη χρήση στεροειδών είναι απαραίτητη η χειρουργική αντιμετώπιση [199].

Χειρουργικές μέθοδοι όπως η μεσοθωρακοσκόπηση και η VATS (video-assisted thoracic surgery) μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για διαγνωστικούς λόγους με εξαιρετικά αποτελέσματα [200].

## **2. ΛΑΝΘΑΝΟΥΣΑ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ**

### **2.1 Ορισμός**

Λανθάνουσα φυματίωση ορίζεται ως η μόλυνση με μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης κατά την οποία τα άτομα φιλοξενούν εντός των διάφορων ιστών τους βιώσιμα μυκοβακτηρίδια. Αυτό δε σημαίνει ότι τα άτομα αυτά αναπτύσσουν κλινική νόσο ή μεταδίδουν τη φυματίωση. Αυτό σχετίζεται με την ανεπάρκεια ή τη μείωση της αντιστάσεως του ανοσοποιητικού του συστήματος κατά τη διάρκεια της ζωής του.

### **2.2 Κλινική ερμηνεία εργαστηριακών εξετάσεων**

Η ακριβής διάγνωση των ατόμων που πάσχουν από λανθάνουσα φυματίωση και η επακόλουθη έναρξη θεραπείας αποτελούν τη βάση για την αποτροπή εμφάνισης νέων περιστατικών ενεργού φυματίωσης.

Μέχρι σήμερα η διάγνωση της LTBI βασιζόταν στην ενδοδερμική φυματινοαντίδραση Mantoux. Ο κύριος ρόλος της φυματινοαντίδρασης Mantoux είναι η διάκριση των ατόμων που έχουν πρόσφατα μολυνθεί από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης ενώ παίζει δευτερεύοντα ρόλο στη διάγνωση της ενεργού νόσου. Τέλος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση του επιπολασμού της μόλυνσης και του ετήσιου κινδύνου ανάπτυξης νόσου. Η φυματινοαντίδραση συνίσταται στην ενδοδερμική έγχυση κεκαθαρωμένης φυματίνης στην εσωτερική επιφάνεια του αντιβράχιου. Η συνιστώμενη δόση είναι 2 TU (0.1 ml) φυματίνης RT-23 (χρησιμοποιείται στην Ελλάδα) ή 5TU PPD-S. Η έγχυση, η οποία πρέπει να είναι αργή, προκαλεί τη δημιουργία μιας φυσαλίδας η οποία απορροφάται μέσα σε 15 λεπτά [201]. Η εκτέλεση της Mantoux είναι γενικά ασφαλής αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις στις οποίες δεν πρέπει να εφαρμόζεται όπως σε ασθενείς με εκτεταμένα δερματικά προβλήματα, όπως έκζεμα, εκτεταμένα εγκαύματα ή εκτεταμένη ψωρίαση, σε άτομα με ιστορικό εμφάνισης φλύκταινας σε προηγούμενη εφαρμογή της Mantoux, σε άτομα με πρόσφατη (τον τελευταίο μήνα) ιογενή λοίμωξη ή ανοσοποίηση με εμβόλιο από ζώντες ιούς. Οι κυριότερες παρενέργειες είναι τοπική αλλεργική αντίδραση (αυξημένο ερύθημα), γενικευμένο ερύθημα είναι δυνατόν να εμφανιστεί σε λιγότερο από 0.1% των ασθενών [202], βλατιδοφλυκταινώδες εξάνθημα

μπορεί να προκληθεί σε λιγότερο από το 5% των εξετασθέντων ενώ πιο σοβαρή μορφή μπορεί να οδηγήσει σε εξέλκωση ή και λεμφαγγειίτιδα, η οποία είναι σπάνια [203]. Άλλες σπάνιες παρενέργειες είναι η εμφάνιση πυρετού, κεφαλαλγίας, αδιαθεσίας, φλυκταινώδους επιπεφυκίτιδας. Η κατά λάθος ενδοφλέβια χορήγηση φυματίνης προκαλεί καταπληξία σε ευαίσθητοποιημένα άτομα. Η ανάγνωση της Mantoux γίνεται μετά από 48-72 ώρες [204]. Υπάρχουν τρεις τεχνικές ανάγνωσης: η χρήση στυλού (ballpoint), με ψηλάφηση (palpation) και με επισκόπηση (inspection). Το ερώτημα δεν αξιολογείται αλλά μόνο η διήθηση του δέρματος που γίνεται αντιληπτή ως σκληρία. Η αξιολόγηση της φυματινοαντίδρασης σε σχέση με το μέγεθος της διαμέτρου της σκληρίας γίνεται ως εξής:

α) η διήθηση δέρματος  $\geq 5\text{mm}$  θεωρείται θετική σε άτομα με πρόσφατη επαφή με ασθενείς με ενεργό TBC, σε άτομα με HIV μόλυνση, που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση οργάνων, σε άτομα με ιωτικά στοιχεία στην ακτινογραφία θώρακα που οφείλονται σε παλαιά επουλωμένη TBC, σε ανοσοκατασταλμένα άτομα (λόγω νοσήματος, λήψης ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων ή  $>15\text{ mg}$  πρεδνιζόνης ημερησίως για έναν μήνα ή παραπάνω).

β) Η διήθηση δέρματος  $\geq 10\text{mm}$  θεωρείται θετική σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, λευχαιμία, λέμφωμα, καρκίνο, γαστρεκτομή, πυριτίαση, απώλεια βάρους  $> 10\%$  του ιδανικού σωματικού βάρους, σε χρήστες ναρκωτικών, σε μετανάστες με άφιξη εντός των τελευταίων πέντε ετών, σε διαμένοντες σε χώρους συναθροίσεως πολλών ατόμων (φυλακές, γηροκομεία, άσυλα αστέγων), στο προσωπικό νοσοκομείων, σε παιδιά  $\leq 4$  ετών που έρχονται σε επαφή με άτομα που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου και τέλος σε φυλές και μειονότητες υψηλού κινδύνου για φυματίωση.

γ) Η διήθηση δέρματος  $\geq 15\text{mm}$  θεωρείται θετική σε άτομα που δεν ανήκουν στις παραπάνω κατηγορίες. Ένα πρόβλημα που σχετίζεται με τη δερματική φυματινοαντίδραση Mantoux είναι οι ψευδώς αρνητικές και οι ψευδώς θετικές αντιδράσεις. Στις ψευδώς αρνητικές αντιδράσεις υπάρχει μόλυνση ή και νόσηση από φυματίωση αλλά η δερμοαντίδραση είναι αρνητική. Τα αίτια μπορεί να είναι βιολογικά ή τεχνικά. Στα βιολογικά ανήκουν η μόλυνση από HIV, ιλαρά, παρωτίτιδα, ανεμευλογιά, η εκτεταμένη πνευμονική ή κεγχροειδής φυματίωση. Κακοήθειες κυρίως το λέμφωμα, η νεφρική ανεπάρκεια, η ασιτία, τα μείζονα χειρουργεία, η ανοσοκαταστολή είτε λόγω χρήσης κορτικοστεροειδών ή χημειοθεραπευτικών ή αντι- TNF παράγοντα ή μετά από μεταμόσχευση μπορούν να προκαλέσουν ψευδώς αρνητική αντίδραση. Τέλος στα βιολογικά αίτια ανήκουν και η πολύ μικρή ή πολύ μεγάλη ηλικία [205-207]. Στα τεχνικά αίτια των ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων ανήκουν η χαμηλής ποιότητας φυματίνη, η



μπορεί να προκληθεί σε λιγότερο από το 5% των εξετασθέντων ενώ πιο σοβαρή μορφή μπορεί να οδηγήσει σε εξέλκωση ή και λεμφαγγειίτιδα, η οποία είναι σπάνια [203]. Άλλες σπάνιες παρενέργειες είναι η εμφάνιση πυρετού, κεφαλαλγίας, αδιαθεσίας, φλυκταινώδους επιπεφυκίτιδας. Η κατά λάθος ενδοφλέβια χορήγηση φυματίνης προκαλεί καταπληξία σε ευαίσθητοποιημένα άτομα. Η ανάγνωση της Mantoux γίνεται μετά από 48-72 ώρες [204]. Υπάρχουν τρεις τεχνικές ανάγνωσης: η χρήση στυλού (ballpoint), με ψηλάφηση (palpation) και με επισκόπηση (inspection). Το ερώτημα δεν αξιολογείται αλλά μόνο η διήθηση του δέρματος που γίνεται αντιληπτή ως σκληρία. Η αξιολόγηση της φυματινοαντίδρασης σε σχέση με το μέγεθος της διαμέτρου της σκληρίας γίνεται ως εξής: α) η διήθηση δέρματος  $\geq 5\text{mm}$  θεωρείται θετική σε άτομα με πρόσφατη επαφή με ασθενείς με ενεργό TBC, σε άτομα με HIV μόλυνση, που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση οργάνων, σε άτομα με ινωτικά στοιχεία στην ακτινογραφία θώρακα που οφείλονται σε παλαιά επουλωμένη TBC, σε ανοσοκατασταλμένα άτομα (λόγω νοσήματος, λήψης ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων ή  $>15\text{ mg}$  πρεδνιζόνης ημερησίως για έναν μήνα ή παραπάνω). β) Η διήθηση δέρματος  $\geq 10\text{mm}$  θεωρείται θετική σε άτομα με σακχαρώδη διαβήτη, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, λευχαιμία, λέμφωμα, καρκίνο, γαστρεκτομή, πυριτίαση, απώλεια βάρους  $> 10\%$  του ιδανικού σωματικού βάρους, σε χρήστες ναρκωτικών, σε μετανάστες με άφιξη εντός των τελευταίων πέντε ετών, σε διαμένοντες σε χώρους συναθροίσεως πολλών ατόμων (φυλακές, γηροκομεία, άσυλα αστέγων), στο προσωπικό νοσοκομείων, σε παιδιά  $\leq 4$  ετών που έρχονται σε επαφή με άτομα που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου και τέλος σε φυλές και μειονότητες υψηλού κινδύνου για φυματίωση. γ) Η διήθηση δέρματος  $\geq 15\text{mm}$  θεωρείται θετική σε άτομα που δεν ανήκουν στις παραπάνω κατηγορίες. Ένα πρόβλημα που σχετίζεται με τη δερματική φυματινοαντίδραση Mantoux είναι οι ψευδώς αρνητικές και οι ψευδώς θετικές αντιδράσεις. Στις ψευδώς αρνητικές αντιδράσεις υπάρχει μόλυνση ή και νόσηση από φυματίωση αλλά η δερμοαντίδραση είναι αρνητική. Τα αίτια μπορεί να είναι βιολογικά ή τεχνικά. Στα βιολογικά ανήκουν η μόλυνση από HIV, ιλαρά, παρωτίτιδα, ανεμευλογιά, η εκτεταμένη πνευμονική ή κεγχροειδής φυματίωση. Κακοήθειες κυρίως το λέμφωμα, η νεφρική ανεπάρκεια, η ασιτία, τα μείζονα χειρουργεία, η ανοσοκαταστολή είτε λόγω χρήσης κορτικοστεροειδών ή χημειοθεραπευτικών ή αντι- TNF παράγοντα ή μετά από μεταμόσχευση μπορούν να προκαλέσουν ψευδώς αρνητική αντίδραση. Τέλος στα βιολογικά αίτια ανήκουν και η πολύ μικρή ή πολύ μεγάλη ηλικία [205-207]. Στα τεχνικά αίτια των ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων ανήκουν η χαμηλής ποιότητας φυματίνη, η

ανεπαρκής συγκέντρωση, η ακατάλληλη αποθήκευση και η χρήση της μετά την ημερομηνία λήξης. Επίσης η λάθος χορήγηση της, η ανάγνωση της πολύ νωρίς ή πολύ αργά και η λάθος καταγραφή του αποτελέσματος μαζί με την απειρία του προσωπικού κατά την ανάγνωση μπορεί να προκαλέσουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Οι ψευδώς θετικές φυματινοαντιδράσεις αναφέρονται στις περιπτώσεις όπου παρατηρείται θετική Mantoux χωρίς να υπάρχει φυματική μόλυνση. Η προηγούμενη ανοσοποίηση με BCG αποτελεί σπουδαίο αίτιο ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Δημοσιευμένες μετα-αναλύσεις δείχνουν ότι τα άτομα που έχουν λάβει BCG έχουν θετικές TST και μάλιστα η λήψη μετά τη νηπιακή ηλικία οδηγεί σε πιο συχνές, επίμονες και μεγαλύτερες σε διάμετρο αντιδράσεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις κατά την αξιολόγηση της Mantoux πρέπει να λαμβάνεται πολύ σοβαρά υπόψη και το ιστορικό του ατόμου καθώς στη παρουσία, ενός εμβολιασμένου με BCG αλλά με υψηλό επιπολασμό φυματίωσης, πληθυσμού η θετική Mantoux μας οδηγεί να σκεφτούμε την πραγματική μόλυνση [208,209]. Ένα άλλο αίτιο ψευδώς θετικής Mantoux είναι η μόλυνση με άτυπα μυκοβακτηρίδια που τα αντιγόνα τους έχουν διασταυρούμενη αντίδραση με τη φυματίνη από PPD. Αυτό εμφανίζεται κυρίως σε πληθυσμούς με υψηλό επιπολασμό ευαισθητοποίησης στα άτυπα και στις περισσότερες περιπτώσεις η δερματική αντίδραση δεν ξεπερνάει τα 10 mm [209]. Τέλος υπερευαισθησία στη φαινόλη, στη γλυκερίνη ή στο θρεπτικό υλικό μπορεί να προκαλέσει ερυθρότητα και διήθηση, οι οποίες όμως παρέρχονται μετά από 48 ώρες από την έγχυση της φυματίνης. Κατά την ερμηνεία της Mantoux πρέπει να λαμβάνονται υπόψη άλλα δύο φαινόμενα. Το boosting effect και η μεταστροφή (conversion). Το boosting effect ορίζεται ως η αύξηση της διαμέτρου της φυματινοαντίδρασης 6 mm ή παραπάνω μετά από επαναλαμβανόμενα τεστ λόγω της αναμνηστικής ανάκλησης της φθίνουσας κυτταρικής μνήμης εξαιτίας απουσίας νέας λοίμωξης. Το φαινόμενο είναι συχνό σε ηλικιωμένους και σε γεννημένους στο εξωτερικό πιθανόν λόγω παλαιάς λοίμωξης αλλά μπορεί να συσχετίζεται και με την ανοσοποίηση με BCG ή λοίμωξη από άτυπα μυκοβακτηρίδια [208]. Για την ιδανικότερη ανίχνευση του φαινομένου η δεύτερη TST πρέπει να επαναλαμβάνεται 1-4 εβδομάδες μετά την αρχική αρνητική TST [210]. Μεταστροφή ορίζεται το φαινόμενο όπου κατά την επανάληψη της Mantoux η διάμετρος της διηθήσεως του δέρματος είναι μεγαλύτερη από 10 mm και η αύξηση της διηθήσεως είναι 10 mm ή περισσότερο μέσα στο μέγιστο χρονικό διάστημα των δυο ετών σαν αποτέλεσμα νέας μυκοβακτηριδιακής λοίμωξης. Όλα τα δεδομένα συνηγορούν ότι η μεταστροφή

αναπτύσσεται τις πρώτες 3-7 εβδομάδες και έχει ολοκληρωθεί μέσα στις 8 εβδομάδες μετά την αρχική μόλυνση [211].

Προκειμένου να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω μειονεκτήματα της φυματινοαντίδρασης Mantoux νέες *in vitro* διαγνωστικές μέθοδοι για την εντόπιση της λανθάνουσας φυματίωσης έχουν ανακαλυφθεί και κυκλοφορούν στο εμπόριο. Οι μέθοδοι αυτοί είναι γνωστοί με το όνομα δοκιμασίες ανίχνευσης ιντερφερόνης- $\gamma$  (interferon- $\gamma$  release assays ή IGRA). Το 2005 το Αμερικάνικο κέντρο για τον έλεγχο και πρόληψη νοσημάτων (US Centers for Disease Control and Prevention) ανακοίνωσε ότι η TST μπορεί να αντικατασταθεί από ένα από τα παραπάνω τεστ (QuantiFERON –TB Gold test) για τη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης [212]. Στην Αγγλία το National Institute for Clinical Excellence συνιστά τη χρήση των IGRA σαν βοηθητικό εργαλείο για τη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης μαζί με τη TST [213]. Το QuantiFERON –TB Gold test (Cellestis Ltd, Australia) χρησιμοποιεί συνθετικά πεπτίδια που μιμούνται δυο ειδικές πρωτεΐνες του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης: το early secretory antigenic target-6 (ESAT-6) και το culture filtrate protein 10 (CFP-10) και επίσης ένα θετικό control (phytohemagglutinin mitogen) και ένα αρνητικό control (αλατούχο διάλυμα / saline). Τα πεπτίδια ESAT-6 και CFP-10 κωδικοποιούνται από γονίδια της περιοχής διαφοροποίησης 1 (region of difference 1 ή RD1) του γονιδιώματος του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης. Τα γονίδια αυτά είναι απόντα από το *M. bovis* και τα περισσότερα άτυπα μυκοβακτηρίδια πχ *M. Avium* αλλά είναι παρόντα σε άλλα όπως τα *M. Kansasii*, *M. Szulgai*, *M. Marinum* και ομόλογά τους υπάρχουν στο *M. leprae*. Το QuantiFERON In-Tube (Cellestis Ltd, Australia) είναι τρίτης γενιάς τεστ το οποίο εκτός από τα ESAT-6 και CFP-10 περιέχει και ένα τρίτο αντιγόνο το TB7.7. Το σετ παρέχει τη δυνατότητα συλλογής του αίματος κατευθείαν σε φιαλίδια που περιέχουν τα αντιγόνα και τους θετικούς και αρνητικούς control. Το T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, UK) λειτουργεί επωάζοντας περιφερικά μονοκύτταρα με αντιγόνα CFP-10 και ESAT-6 και μετρώντας τον αριθμό των κυττάρων που παράγουν IFN- $\gamma$  χρησιμοποιώντας τη μέθοδο enzyme-linked immunospot / Elispot. Η αδυναμία όλων των μελετών να συγκρίνουν την ευαισθησία όλων των παραπάνω διαγνωστικών μεθόδων για τη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης οφείλεται στην έλλειψη μιας χρυσής τομής στη διάγνωση της. Βασίζόμενοι σε μελέτες σε άτομα με ενεργό φυματίωση φαίνεται ότι η συνολική ευαισθησία της TST είναι χαμηλότερη από της QFT ενώ την υψηλότερη τη διαθέτει το Elispot [214]. Η συνολική ειδικότητα του QFT υπολογίζεται σε 97.7% (CI: 96-99%), του Elispot σε 92.5 % (CI: 86-99%). Η ειδικότητα

των παραπάνω μεθόδων παραμένει ανεπηρέαστη από προηγούμενη ανοσοποίηση με BCG ενώ και το QFT και το Elispot είναι πολύ πιο ειδικά από την TST σε προηγούμενα εμβολιασμένους πληθυσμούς [214]. Οι παραπάνω μελέτες τονίζουν τη σημασία της χρήσης των IGRA στον προσδιορισμό της αληθούς λανθάνουσας φυματίωσης σε προηγούμενα εμβολιασμένους πληθυσμούς ή σε άτομα με έκθεση σε άτυπα μυκοβακτηρίδια.

Στον πίνακα 10 βλέπουμε συνοπτικά τα κυριότερα χαρακτηριστικά των τριών διαγνωστικών μεθόδων για τη λανθάνουσα φυματίωση

Πίνακας 10. Διαγνωστικές μέθοδοι λανθάνουσας φυματίωσης

	TST	QFT-Gold ή QFT-Gold in Tube	T-SPOT.TB
Χορήγηση	In vivo(ενδοδερμικά)	Ex vivo(Elisa based)	Ex vivo(Elispot based)
Αντιγόνα	PPDS ή PPDRT-23	ESAT6, CFP10, ±TB7.7	ESAT6, CFP10
Μονάδες μέτρησης	mm σκληρίας	IU της IFN-γ	IFN-γ Spot Forming Cells
Ορισμός θετικού τεστ	5, 10, 15 mm	IFN-γ ≥ 0.35 IU/ml (αφού αφαιρεθεί η IFN-γ ως απάντηση στο αρνητικό control)	Κύτταρα που παράγουν IFN-γ ≥ 6, με 250000κύτταρα ανά φρέαρ και τουλάχιστον διπλό αρνητικό φρέαρ
Ενδιάμεσο αποτέλεσμα	Σε ύπαρξη ανεργίας	Φτωχή απάντηση στο μιτογόνο ή αυξημένη απάντηση στο αρνητικό φρέαρ	Φτωχή απάντηση στο μιτογόνο ή αυξημένη απάντηση στο αρνητικό φρέαρ
Χρόνος μέτρησης	48-72 ώρες	16-24 ώρες	16-24 ώρες
Κόστος εξέτασης	12.73 \$	41 \$	85\$

(Πίνακας από: PDO Davies, PF Barnes, SB Gordon. Clinical tuberculosis, Fourth Edition)

### 2.3 Θεραπεία λανθάνουσας φυματικής λοίμωξης

Η ιδέα της πρόληψης της εμφάνισης φυματίωσης με την εφαρμογή θεραπείας σε άτομα που έχουν έρθει σε επαφή με το μυκοβακτηρίδιο χωρίς να εμφανίζουν κλινικά ευρήματα της νόσου συζητάται από παλιά καθώς αυτά τα άτομα εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη φυματίωσης. Ο κίνδυνος αυτός υπολογίζεται στο 10% καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής και είναι αυξημένο στα παιδιά, στους ανοσοκατεσταλμένους και σε άτομα με ινώδεις αλλοιώσεις στην ακτινογραφία θώρακος [215]. Οι δοκιμές που έχουν γίνει μετά την εμφάνιση αντιβιοτικών ενεργών έναντι της φυματίωσης καταδεικνύουν ότι σωστή συνταγογράφηση και εφαρμογή προφυλακτικής θεραπείας μειώνει το κίνδυνο νόσησης από φυματίωση περίπου κατά 54-88% [216].

Η απόφαση για χορήγηση ή όχι χημειοπροφύλαξης εξαρτάται από την τιμή της φυματινοαντίδρασης, από το ιστορικό του ασθενούς και από την ύπαρξη ή όχι συνοδών νοσημάτων. Σύμφωνα με τις οδηγίες της Αμερικάνικης Θωρακικής Εταιρείας οι ενδείξεις της χορήγησης θεραπείας λανθάνουσας φυματικής λοίμωξης είναι οι εξής: α) σε άτομα σε στενή επαφή με λοιμογόνο φυματικό ασθενή εφόσον έχουν αρνητική Mantoux λαμβάνουν χημειοπροφύλαξη για 2-3 μήνες και μετά επαναλαμβάνουν τη Mantoux, άτομα με HIV λαμβάνουν πλήρη χημειοπροφύλαξη ανεξαρτήτως της τιμής της Mantoux, ενώ αν η Mantoux  $\geq 5\text{mm}$  όλοι λαμβάνουν πλήρη χημειοπροφύλαξη, β) σε άτομα με γνωστή ή ύποπτη λοίμωξη από HIV και Mantoux  $\geq 5\text{mm}$ , γ) σε άτομα με σταθερά ακτινολογικά ευρήματα συμβατά με παλαιά φυματίωση και Mantoux  $\geq 5\text{mm}$ , δ) ασθενείς με μεταμόσχευση οργάνων ή ανοσοκατεσταλμένοι και Mantoux  $\geq 5\text{mm}$ , ε) σε άτομα ηλικίας κάτω των 35 ετών με μεταστροφή της Mantoux από αρνητική σε θετική τα τελευταία δύο έτη και Mantoux  $\geq 10\text{mm}$  ενώ αν είναι άνω των 35 ετών πρέπει η Mantoux  $\geq 15\text{mm}$ , στ) σε άτομα με παθολογικές καταστάσεις που αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης φυματίωσης, όπως πυριτίαση, αιματολογικά και νοσήματα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου, γαστρεκτομή, νηστιδοειλεακή παράκαμψη, αρρυθμιστος σακχαρώδης διαβήτης, αστιτία, χρήση ενδοφλέβιων ναρκωτικών, παρατεταμένη χρήση κορτικοειδών, με Mantoux  $\geq 10\text{mm}$ , ζ) σε άτομα που έχουν γεννηθεί σε χώρες με υψηλό επιπολασμό της νόσου, με ανεπαρκή ιατρική φροντίδα και χαμηλό εισόδημα, τρόφιμοι ιδρυμάτων, άστεγοι, ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό εφόσον εμφανίζουν Mantoux  $\geq 10\text{mm}$  [217].

Η επιλογή του κατάλληλου φαρμακευτικού σκευάσματος και της διάρκειας χορήγησης του είναι πολύ σημαντικά για το θετικό αποτέλεσμα της θεραπείας. Στις περισσότερες μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί η ισονιαζίδη. Σύμφωνα με τις Βρετανικές οδηγίες (BTS-Βρετανική Εταιρεία Θώρακος) συνιστάται η χορήγηση ισονιαζίδης για 6 μήνες προκειμένου να υπάρξει ισορροπία ανάμεσα στον κίνδυνο και την δραστικότητα [218]. Σύμφωνα με τις Αμερικάνικες οδηγίες (ATS-Αμερικανική Εταιρεία Θώρακος) η συνιστώμενη διάρκεια είναι 9 μήνες [217]. Οι ασθενείς πρέπει να βρίσκονται υπό παρακολούθηση [219] ενώ η επιπρόσθετη χορήγηση βιταμίνης Β<sub>6</sub> συνιστάται σε ηλικιωμένους, σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη, σε εγκύους και σε αλκοολικούς, δηλαδή άτομα που εμφανίζουν κίνδυνο ανάπτυξης νευροπάθειας [220]. Η ριφαμπικίνη έχει προταθεί σαν εναλλακτικό φάρμακο για άτομα που δεν μπορούν να ανεχθούν την ισονιαζίδη ή έχουν έρθει σε επαφή με άτομα με φυματίωση ανθεκτική στην ισονιαζίδη. Υπάρχουν λίγα δεδομένα για την αποτελεσματικότητα της ενώ δε συνιστάται σε άτομα θετικά στον HIV [217]. Η αποτελεσματικότητα του συνδυασμού ισονιαζίδης-ριφαμπικίνης για 3 μήνες έχει αποδειχθεί σε παιδιά με πρόσφατη επαφή [221] και σε HIV-αρνητικούς ενήλικες [222] και χρησιμοποιείται κυρίως στη Βρετανία [218]. Τέλος ο συνδυασμός ριφαμπικίνης και πυραζιναμίδης λόγω των πολύ σοβαρών παρενεργειών και της θανατηφόρας ηπατικής ανεπάρκειας που μπορεί να προκαλέσει δεν χρησιμοποιείται πλέον [223].

Το κυριότερο πρόβλημα που υπάρχει στην πρακτική της θεραπείας λανθάνουσας φυματίωσης και το οποίο πρέπει να αντιμετωπιστεί είναι το χαμηλό ποσοστό συμμόρφωσης των ασθενών και του ιατρικού προσωπικού στη συνιστώμενη θεραπεία [224]. Πρόσφατες αναλύσεις δείχνουν ότι η χημειοπροφύλαξη αποτελεί πρακτική με ικανοποιητική σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας (highly cost-effective) κυρίως σε άτομα με πρόσφατη επαφή [225] καταδεικνύοντας τη μεγάλη σημασία σωστής εφαρμογής της στον πληθυσμό.

## 2.4 Ανοσοποίηση με BCG

Η δυνατότητα ανάπτυξης ανοσίας του οργανισμού έναντι της φυματίωσης παρατηρήθηκε και διατυπώθηκε για πρώτη φορά από τον Marfan το 1886, ο οποίος παρατήρησε ότι άτομα που νόσησαν και θεραπεύτηκαν από φυματίωση των λεμφαδένων

δεν παρουσίαζαν πνευμονική φυματίωση [226]. Στη συνέχεια ένα λοιμογόνο στέλεχος του *Mycobacterium bovis* απομονώθηκε το 1902 από τον Nocard σε γάλα από αγελάδα με φυματιώδη μαστίτιδα [227]. Το στέλεχος αυτό εμβολιάστηκε (προστέθηκε), για πρώτη φορά το 1908 από τους Albert Calmette και Camille Guérin σε μέσο καλλιέργειας αποτελούμενο από μαγειρεμένη πατάτα και χολή με γλυκερίνη [228] οπότε παρατηρήθηκε εξασθένιση των βακίλων. Το στέλεχος, το οποίο έγινε γνωστό ως bacille Calmette-Guerin (BCG), δημιουργήθηκε τελικά μετά από 230 ανακαλλιέργειες ενός λοιμογόνου στελέχους *M. bovis* από το 1908-1921, οπότε πλέον δεν άλλαξε τα χαρακτηριστικά του και έχασε τη μολυσματικότητά του. Οι παραπάνω παρατηρήσεις και πειραματικές μελέτες σε ζώα έγιναν στην προσπάθεια ανάπτυξης εμβολίου έναντι της φυματίωσης για την προστασία των ζώων. Το εμβόλιο χρησιμοποιήθηκε σε άνθρωπο για πρώτη φορά το 1921 στη Γαλλία [229]. Σήμερα περίπου 100 εκατομμύρια παιδιά εμβολιάζονται με BCG κάθε χρόνο [230]. Ο αριθμός των δόσεων που παρήχθησαν το 2000 σε καθοδική σειρά είναι τα στελέχη Copenhagen 1331, D2PB302, Tokyo 172, Sofia SL222, Pasteur 1173, Glaxo 1077 και το Ρωσικό στέλεχος [230].

Βάσει των στοιχείων ο WHO συνιστά σε περιοχές με υψηλό επιπολασμό σε φυματίωση τη χρήση του εμβολίου σε όλα τα νεογέννητα παιδιά όσον το δυνατόν νωρίτερα στη ζωή τους, ακόμα και σε περιοχές ενδημικές στο AIDS. Στην περίπτωση βρεφών που έχουν εκτεθεί αμέσως μετά τη γέννηση τους σε περιστατικό φυματίωσης με άμεσο παρασκεύασμα θετικό συνίσταται η αναβολή του εμβολιασμού μετά την ολοκλήρωση εξαμήνου προφυλακτικού σχήματος με ισονιαζίδη [231]. Επίσης ο εμβολιασμός συνίσταται σε βρέφη και παιδιά με αρνητική Mantoux με παρατεταμένη έκθεση σε περιβάλλον ασθενών με ενεργό πνευμονική φυματίωση χωρίς θεραπεία ή ατελώς θεραπευόμενων ή με παρατεταμένη και σωστή θεραπεία ασθενών και κυρίως όταν η φυματίωση είναι ανθεκτική σε ισονιαζίδη και ριφαμπικίνη. Επίσης η εφαρμογή του BCG συνίσταται σε παιδιά με αρνητική Mantoux, τα οποία ανήκουν σε ομάδες πληθυσμού που η ετήσια αύξηση των μολύνσεων ξεπερνά το 0.1% και στις οποίες η θεραπεία, η επιτήρηση και η υγειονομική φροντίδα είναι πλημμελείς [232]. Χώρες με χαμηλό επιπολασμό σε φυματίωση μπορούν να επιλέξουν τον περιορισμό του εμβολιασμού σε νεογνά και βρέφη με αυξημένο κίνδυνο για νόσηση ή σε μεγαλύτερης ηλικίας παιδιά με αρνητική Mantoux. Σε ορισμένες περιοχές ο εμβολιασμός με BCG έχει αντικατασταθεί με εντατικοποιημένες προσπάθειες για ανίχνευση περιστατικών φυματίωσης και υπό έλεγχο θεραπείας αυτών. Επειδή πολλές αναπτυγμένες χώρες είναι πιθανόν ότι θα αναθεωρήσουν

το πρόγραμμα του εμβολισμού με BCG η International Union Against Tuberculosis and Lung Disease ανέπτυξε κριτήρια που ορίζουν τη «χαμηλή ενδημικότητα». Προκειμένου να γίνει αλλαγή από γενικευμένο σε επιλεγμένο εμβολιασμό με BCG πρέπει να ισχύουν εκτός από προγράμματα έγκαιρης διάγνωσης και ένα τουλάχιστον από τα εξής κριτήρια: 1) ένα, κατά μέσο όρο, ετήσιο ποσοστό περιστατικών πνευμονικής φυματίωσης με θετικό άμεσο παρασκεύασμα κατώτερο των 5 ανά 100000, ή 2) κατά μέσο όρο ετήσιο ποσοστό περιστατικών φυματιώδους μηνιγγιτιδας σε παιδιά κάτω των 5 ετών μικρότερο από 1 σε 10 εκατομμύρια πληθυσμό τα προηγούμενα 5 χρόνια ή 3) ετήσιος κίνδυνος μόλυνσης με φυματίωση μικρότερος του 0.1% [231]. Ερωτήματα έχουν προκύψει για το αν θα πρέπει να εμβολιάζεται το ενήλικο ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό που βρίσκεται σε αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης με *M. tuberculosis* και αυτό λόγω των στοιχείων που καταδεικνύουν μικρή ή και καθόλου προστασία των ενηλίκων από το εμβόλιο. Μερικές αναλύσεις ευνοούν τη χρήση του εμβολίου σε αυτούς τους εργαζόμενους [233] και τελικά σε περιοχές που έχει αποδειχθεί ότι το BCG προσφέρει οφέλη σε ενήλικες, όταν το ιατρικό προσωπικό παρουσιάζει μεγάλο κίνδυνο μόλυνσης από φυματίωση και όταν παρατηρείται πολυανθεκτική φυματίωση η εφαρμογή του BCG αξίζει να ληφθεί υπόψη.

Στην Ελλάδα ο εμβολιασμός με το BCG ήταν υποχρεωτικός με νόμο του 1960 και γινόταν όταν το παιδί έφτανε στην ηλικία των 12 ετών. Από το 1988 ο εμβολιασμός γίνεται στην ηλικία των 6 ετών ή κατά τη γέννηση όταν τα παιδιά βρίσκονται σε περιβάλλοντα αυξημένου κινδύνου. Όσον αφορά στη χώρα μας το πρόγραμμα εμβολιασμού με το αντιφυματικό εμβόλιο είναι ενιαίο και η συγκατάθεση των κηδεμόνων είναι απαραίτητη για την εφαρμογή του [234]. Σύμφωνα με μια έρευνα η κάλυψη των εμβολιασμένων στην Ελλάδα το 2003 ήταν 31% που χαρακτηρίζεται ως χαμηλή [235].

Το εμβόλιο BCG πρέπει να φυλάσσεται στην ψύξη, να προστατεύεται από το φως και να διαλύεται μόνο αμέσως πριν τη χορήγηση του εμβολίου. Στις περισσότερες χώρες το εμβόλιο χορηγείται με ενδοδερμική ένεση με βελόνα 25-26 gauge στην περιοχή του δελτοειδούς. Οι περισσότεροι κατασκευαστές συνιστούν τη χορήγηση δόσης 0.05 ml για τα βρέφη και διπλάσια δόση για τα παιδιά [236]. Η φυσιολογική αντίδραση μετά τον εμβολιασμό είναι η δημιουργία στο σημείο χορήγησης μιας κόκκινης σκληρίας 5-15 mm. Στη συνέχεια μια κρούστα, η οποία είναι μαλακή στο κέντρο, δημιουργείται γύρω από τη διήθηση για 3-4 εβδομάδες. Σε 6-10 εβδομάδες η κρούστα πέφτει αφήνοντας μια επίπεδη ουλή διαμέτρου 3-7 mm [237]. Η ανάπτυξη περιοχικής λεμφαδενοπάθειας χωρίς όμως τη



συνύπαρξη ερυθήματος η φλύκταινας πρέπει να θεωρηθεί φυσιολογική αντίδραση στο εμβόλιο [238]. Η Mantoux γίνεται θετική μετά από 6-12εβδομάδες.

Οι επιπλοκές του εμβολιασμού είναι λίγες και συμβαίνουν στο 1-10% των εμβολιασθέντων. Οι κυριότερες είναι α) το τοπικό απόστημα ως αποτέλεσμα δευτερογενούς μόλυνσης ή υποδόριας εγχύσεως του εμβολίου λόγω αδέξιου χειρισμού, β) μεγάλα άτονα έλκη στη θέση του εμβολιασμού που υπερβαίνουν σε διάμετρο τα 10mm και επιμένουν πέρα των 3 εβδομάδων, γ) τοπική λυκοειδής αντίδραση που συμβαίνει κυρίως όταν η θέση του εμβολιασμού επικαλύπτεται πολύ από τα ρούχα, δ) οζώδες ερύθημα, ε) έκζεμα, στ) χειλοειδή σε άτομα με ειδική προδιάθεση, ζ) έντονες και εκτεταμένες αντιδράσεις μασχαλαίων και τραχηλικών λεμφαδένων που συνοδεύονται από διαπύηση. Άλλες πιο σπάνιες επιπλοκές που έχουν αναφερθεί είναι η ιριδίτις, η ωτίτιτιδα, η κερατοεπιπεφυκίτιδα, λεμφαδενική διόγκωση του μεσοθωρακίου και του μεσεντερίου, πυρετός, μηνιγγίτιδα, ενώ μόνο σε μια περίπτωση έχει αναφερθεί πνευμονική φυματίωση ως επιπλοκή [232].

Ο εμβολιασμός με BCG αντενδείκνυται σε ορισμένες ομάδες ατόμων κυρίως σε άτομα με διαταραχές του ανοσοβιολογικού τους συστήματος. Έτσι πρέπει να αποφεύγεται σε άτομα HIV θετικά ή με συγγενή ανοσοανεπάρκεια, σε άτομα με λευχαιμία, λέμφωμα, με χρόνια νεφρίτιδα, με υπογαμμασφαιριναιμία, με εκτεταμένες δερματοπάθειες και έκζεμα. Επίσης, δεν πρέπει να εφαρμόζεται κατά την κύηση, σε βρέφη με μικρό σωματικό βάρος και σε άτομα που λαμβάνουν ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (στεροειδή, χημειοθεραπευτικά) ή εφαρμόζουν χημειοθεραπευτικά σχήματα με ακτινοβολίες.

Αν και είναι δύσκολος ο σχεδιασμός μελετών που να υπολογίζουν επακριβώς την αποτελεσματικότητα του BCG σε μια σχετικά πρόσφατη αναδρομική ανάλυση 26 ερευνητικών εργασιών παρατηρήθηκε συνολική αποτελεσματικότητα 50% [239] ενώ σε άλλες μελέτες ευρέθη 20-80% [240]. Πέντε προοπτικές μελέτες εξέτασαν την αποτελεσματικότητα του εμβολίου έναντι του θανάτου από φυματίωση, στις τέσσερις παρατηρήθηκε αποτελεσματικότητα πάνω από 80% ενώ σε μια δεν παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση [241]. Αρκετές αναδρομικές μελέτες εξέτασαν την παροχή προστασίας έναντι κεγχροειδούς και φυματιώδους μηνιγγίτιδας με δραστηριότητα πάνω από 80% [242]. Τρεις προοπτικές μελέτες εξέτασαν την αποτελεσματικότητα του εμβολίου σε νεογέννητα και βρέφη υπολογίζοντας την περίπου 50-80% [241,243,244]. Τέλος δυο αναδρομικές μελέτες ανάμεσα σε εφήβους και ενήλικες έδειξαν αποτελεσματικότητα 10% [245] και περίπου 60% [246] αντίστοιχα.

Ανεξάρτητα από την παραπάνω παρατηρούμενη αποτελεσματικότητα το εμβόλιο BCG παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα, τα οποία καθιστούν την παρασκευή νέου εμβολίου απαραίτητη. Τα μειονεκτήματα αυτά είναι η ανεπαρκής προστασία έναντι της πρωτοπαθούς λοίμωξης ή της ενεργοποίησης της λανθάνουσας φυματικής λοίμωξης, η μη δυνατότητα χορήγησης του σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα και η μείωση της διαγνωστικής αξίας της φυματινοαντίδρασης Mantoux. Τα τελευταία έτη γίνονται προσπάθειες σε πειραματόζωα για την ανάπτυξη νέου αντιφυματικού εμβολίου. Τα υπό δοκιμή εμβόλια αποτελούνται είτε από εξασθενημένα μυκοβακτηρίδια με επιλεκτικές αλύσους DNA ή από κεκαθαυμένα τμήματα του μυκοβακτηριδίου. Σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Scriba et al αποτίμησαν την ασφάλεια και ταυτοποίησαν την απάντηση των λεμφοκυττάρων που προκλήθηκε από τη χορήγηση τριών δόσεων ενός νέου υποψήφιου εμβολίου, του MVA85A, σε εμβολιασμένα με BCG βρέφη σε ενδημικό για φυματίωση περιβάλλον. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι το υποψήφιο εμβόλιο ήταν ασφαλές χωρίς σημαντικές παρενέργειες και ότι προκαλούσε ισχυρή και μεγάλης διάρκειας απάντηση των CD4 και CD8 T λεμφοκυττάρων, κρίνοντας το ικανό να εμποδίσει την ανάπτυξη φυματίωσης σε βρέφη [247]. Πάντως ο αγώνας της πρόληψης έναντι της φυματίωσης είναι δύσκολος εξαιτίας και της εξαιρετικής δυνατότητας του μικροοργανισμού να μεταλλάσσεται αλλά και να επιβιώνει για πολλά χρόνια μέσα στον οργανισμό του ξενιστή.

### 3. ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΙΝΤΕΡΦΕΡΟΝΗΣ- $\gamma$ (INTERFERON- $\gamma$ RELEASE ASSAYS)

Έχει υπολογιστεί ότι το 1/3 του παγκόσμιου πληθυσμού έχει μολυνθεί από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Ο μεγάλος αυτός αριθμός ατόμων με λανθάνουσα φυματίωση αποτελεί εμπόδιο στην προσπάθεια εξάλειψης της φυματίωσης καθιστώντας τη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης και τη θεραπεία των μολυσμένων ατόμων πάρα πολύ σημαντική. Μέχρι πρόσφατα η δερμοαντίδραση Mantoux ήταν η μόνη διαγνωστική μέθοδος για τη λανθάνουσα λοίμωξη. Αν και έχει αποδειχτεί χρήσιμη στην κλινική πράξη εμφανίζει περιορισμούς ως προς την αξιοπιστία και την ακρίβεια της [248]. Μια σημαντική επανάσταση τα τελευταία χρόνια αποτελεί η ανάπτυξη in vitro δοκιμασιών, οι οποίες υπολογίζουν την απελευθέρωση ιντερφερόνης- $\gamma$  από διεγερμένα, μετά από επαφή με ειδικά για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης αντιγόνα, T-λεμφοκύτταρα. Οι τεχνικές αυτές ονομάζονται «Δοκιμασίες Απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$ » ή interferon- $\gamma$  release assays ή IGRAs. Τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται σε αυτές τις τεχνικές είναι συνθετικά πεπτιδία που μιμούνται τρεις ειδικές για το μυκοβακτηρίδιο πρωτεΐνες το early secretory antigenic target 6 (ESAT 6), το culture filtrate protein 10 (CFP10) και το TB7.7. Τα αντιγόνα αυτά κωδικοποιούνται από γονίδια που βρίσκονται στο τμήμα του γονιδιώματος που αποτελεί την περιοχή διαφοροποίησης 1 (region of difference 1 /RD1). Τα αντιγόνα αυτά λείπουν από το εμβόλιο BCG και από τα περισσότερα άτυπα μυκοβακτηρίδια με εξαίρεση τα *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*.

#### 3.1 Είδη τεχνικών

Τα τελευταία χρόνια δυο είδη μεθόδων IGRA είναι εμπορικά διαθέσιμα. Το πρώτο ονομάζεται QuantiFERON –TB Gold assay (Εικόνα 1). Έχει κατασκευαστεί από την εταιρεία Cellestis Ltd, με έδρα το Carnegie της Victoria στην Αυστραλία, και διατίθεται σε δυο τύπους: α) στον τύπο 24-well culture plate format (την πλάκα με τα 24 φρεάτια), ο οποίος έχει εγκριθεί από τον Αμερικάνικο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (US Food and Drug Administration) και χρησιμοποιείται στην Αμερική και β) έναν πιο σύγχρονο και απλό τύπο το QuantiFERON –TB Gold in tube assay, ο οποίος διαθέτει φιαλίδια συλλογής αίματος τα οποία είναι ήδη επικαλυμμένα με τα αντιγόνα. Ο δεύτερος τύπος

χρησιμοποιείται σε χώρες εκτός Αμερικής. Τα QuantiFERON –TB Gold assay μετράνε τη συγκέντρωση της παραγόμενης ιντερφερόνης- $\gamma$  με τη μέθοδο ανοσοπροσφορητικής ανάλυσης στερεάς φάσης (ELISA).

Η δεύτερη τεχνική IGRA που είναι εμπορικά διαθέσιμη είναι το T-SPOT. TB. Έχει κατασκευασθεί από την εταιρεία Oxford Immunotech με έδρα το Oxford στο Ηνωμένο Βασίλειο. Διατίθεται σε δυο μορφές: α) στον τύπο με την πλάκα των 96 φρεατίων (96-well plate) ή T-SPOT.TB 96 (Εικόνα 2) και β) στον τύπο με τις ταινίες 8 φρεατίων (8-well strips) ή T-SPOT.TB 8 (Εικόνα 3). Αν και δεν έχει εγκριθεί ακόμα στην Αμερική έχει εκδοθεί άδεια χρήσης του στην Ευρώπη και στον Καναδά. Το T-SPOT. TB assay απαριθμεί τα T- κύτταρα που παράγουν ιντερφερόνη- $\gamma$  χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ELISPOT [249]



Εικόνα 1



Εικόνα 2



Εικόνα 3

### 3.2 Πρωτόκολλα τεχνικών

#### 3.2α Πρωτόκολλο τεχνικής QuantiFERON –TB Gold in tube assay

Η διαδικασία που πρέπει να ακολουθηθεί για την απόκτηση βέλτιστων αποτελεσμάτων με τη χρήση του QuantiFERON –TB Gold in tube assay είναι η εξής:

##### A) Συλλογή και χειρισμός των δειγμάτων

Για κάθε ασθενή συλλέγεται μετά από φλεβοκέντηση 1 ml αίματος για κάθε ένα από τα τρία ηπαρινισμένα QuantiFERON –TB Gold in tube φιαλίδια συλλογής αίματος. Το πρώτο φιαλίδιο είναι επικαλυμμένο με τα αντιγόνα ESAT6, CFP10 και το TB7.7. Το δεύτερο φιαλίδιο αποτελεί τον αρνητικό ρυθμιστή (negative control) και το τρίτο φιαλίδιο περιέχει το μιτογόνο (mitogen control), και είναι επικαλυμμένο με φυτοαιμαγλουτινίνη. Το μιτογόνο στο τρίτο φιαλίδιο διεγείρει τα T- λεμφοκύτταρα καταφέροντας να προσδιορίσει αν υπάρχουν βιώσιμα και λειτουργικά κύτταρα. Στη συνέχεια ανακατεύονται τα φιαλίδια με ανακίνηση πάνω- κάτω περίπου 10 φορές ώστε όλη η εσωτερική επιφάνεια των φιαλιδίων να επικαλυφθεί με αίμα. Μετά την προσεχτική επικόλληση ετικετών τοποθετούνται τα φιαλίδια, μέσα σε 16 ώρες από τη συλλογή των δειγμάτων, σε επωαστικό θάλαμο στους 37 ° C για 16-24 ώρες. Ο επωαστικός θάλαμος δεν χρειάζεται CO<sub>2</sub> ή εφύγραση.

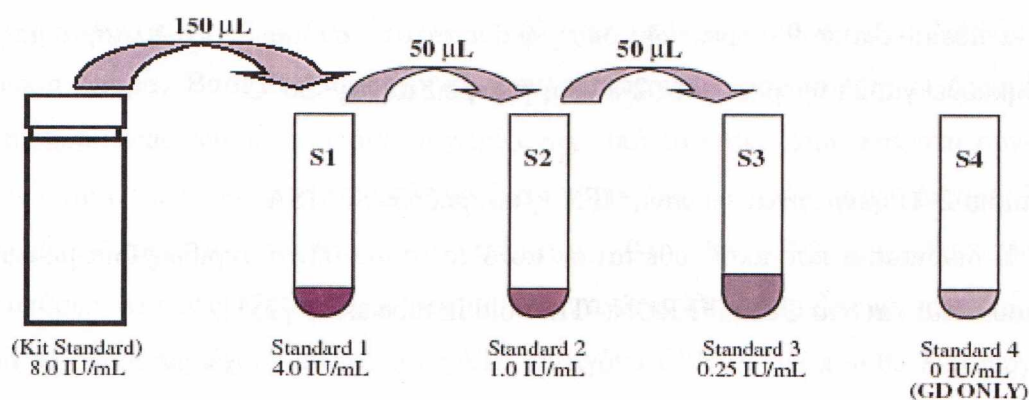
## B) Στάδιο 1- Επώαση αίματος και λήψη του πλάσματος

Μετά την επώαση στους 37 ° C για 16-24 ώρες τα φιαλίδια συλλογής αίματος μπορούν να διατηρηθούν στους 2-27 ° C για, το μέγιστο, τρεις μέρες προτού φυγοκεντρηθούν. Η λήψη του πλάσματος διευκολύνεται με τη φυγοκέντρηση των φιαλιδίων για 15 λεπτά στους 2000-3000 RCF (g). Το βύσμα gel που υπάρχει στα φιαλίδια ξεχωρίζει τα κύτταρα από το πλάσμα. Τα δείγματα πλάσματος μπορούν να μεταφερθούν άμεσα στην QuantiFERON –TB Gold in tube πλάκα ή μπορούν να αποθηκευθούν στους 2-8 ° C για, το μέγιστο, τέσσερις εβδομάδες ή σε θερμοκρασία μικρότερη των -70 ° C για εκτεταμένη χρονική περίοδο.

## Γ) Στάδιο 2- Παραγωγή ανθρώπινης IFN- γ και μέθοδος ELISA

Όλα τα δείγματα πλάσματος και τα αντιδραστήρια με εξαίρεση το Conjugate 100x Concentrate(συμπυκνωμένο σύζευγμα 100x) πρέπει να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση τους. Για αυτό το λόγο αφήνονται τουλάχιστον για 60 λεπτά για να επιτευχθεί εξισορρόπηση. Αφαιρούνται οι ταινίες που δεν θα χρησιμοποιηθούν από την πλάκα. Στη συνέχεια ανασυντίθεται το κατεψυγμένο Kit Standard(βαθμονομητή Kit) με τον όγκο του απιονισμένου ή αποσταγμένου νερού όπως υποδεικνύεται στην ετικέτα του φιαλιδίου Standard. Αναμιγνύεται απαλά ώστε να μειωθεί η παραγωγή αφρού και να επιβεβαιωθεί η τέλεια διαλυτότητα. Το διάλυμα που προκύπτει έχει συγκέντρωση 8.0 IU/ml. Το ανασυντιθέμενο Kit Standard διάλυμα χρησιμοποιείται για την παραγωγή τεσσάρων σειρών διαλυμάτων IFN-γ στο Green Diluent(πράσινο αραιωτικό) (S1-S4) όπως δείχνει το σχήμα 1. Το S1 έχει συγκέντρωση 4 IU/ml, το S2 έχει 1 IU/ml, το S3 περιέχει 0.25 IU/ml και το S4 έχει 0 IU/ml (είναι μόνο Green Diluent). Στη συνέχεια ανασυντίθεται το κατεψυγμένο Conjugate 100x Concentrate με 0.3 ml αποιονισμένο ή απεσταγμένο νερό με ελαφρά ανακίνηση για την αποφυγή δημιουργίας αφρού και για την επίτευξη μέγιστης διαλυτότητας. Το Working Strength conjugate παρασκευάζεται διαλύοντας το Conjugate 100x Concentrate σε Green Diluent σύμφωνα με τις οδηγίες. Στη συνέχεια τοποθετούνται 50μl του Working Strength conjugate με μια πιπέτα στα φρεάτια της ELISA, 50μl των εξεταζόμενων δειγμάτων πλάσματος στα κατάλληλα φρεάτια και τέλος 50μl των Standards 1-4 ανάλογα αν χρησιμοποιείται το φιαλίδιο με το μιτογόνο ή όχι. Αναμιγνύονται τα παραπάνω με τη χρήση ενός αναδευτήρα μικροπλάκας για 1 λεπτό. Σκεπάζεται η πλάκα με ένα καπάκι και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Διαλύονται 1 μέρος Wash Buffer 20x Concentrate(συμπυκνωμένο ρυθμιστικό δ/μα πλύσης

20x) με 19 μέρη αποσταγμένου νερού παράγοντας το Working Strength wash buffer. Ξεπλένονται τα φρεάτια της πλάκας με 400μL Working Strength wash buffer για τουλάχιστον 6 κύκλους και στη συνέχεια αφαιρείται όλο το wash buffer. Προστίθενται 100μL Enzyme Substrate Solution(δ/μα ενζυμικού υποστρώματος) σε κάθε φρέαρ και αναμιγνύεται καλά με αναδευτήρα. Καλύπτεται η πλάκα με καπάκι και αφήνεται σε 30 λεπτών επώαση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται σε κάθε φρεάτιο 50μL Enzyme Stopping Solution(ανασχετικό δ/μα enzyme) και γίνεται ανάδευση. Τέλος μετράται η οπτική πυκνότητα (optical density / OD) κάθε φρεατίου 5 λεπτά αφού έχει σταματήσει η αντίδραση χρησιμοποιώντας ένα 450 nm φίλτρο και ένα 620-650 nm φίλτρο αναφοράς. Οι τιμές της οπτικής οξύτητας θα χρησιμοποιηθούν από το ειδικό λογισμικό QuantiFERON-TB Gold IT Analysis Software για να εξάγει τα τελικά αποτελέσματα [250].



Σχήμα 1 Προετοιμασία των διαλυμάτων standard

### 3.2β Πρωτόκολλο τεχνικής QuantiFERON –TB Gold assay

Η διαδικασία που πρέπει να ακολουθηθεί για την εφαρμογή του QuantiFERON –TB Gold assay είναι η εξής:

#### A) Συλλογή και χειρισμός των δειγμάτων

Γεμίζεται ένα ηπαρινισμένο φιαλίδιο αίματος τουλάχιστον 5ml με το δείγμα του ασθενούς. Ανακατεύεται με ήπιες ανακινήσεις πολλές φορές ώστε να διαλυθεί η ηπαρίνη και μεταφέρεται στο εργαστήριο σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση του αίματος με τα

αντιγόνα ESAT6 και CFP 10 πρέπει να γίνει το νωρίτερο δυνατόν και όχι μετά από περισσότερο από 12 ώρες.

#### B) Στάδιο 1- Επώαση αίματος και λήψη του πλάσματος

Τα δείγματα αίματος πριν τη διανομή τους στα φρεάτια της πλάκας πρέπει να αναμιχθούν καλά και αυτό μπορεί να γίνει με την ανακίνηση τους για 20 φορές. Στη συνέχεια τοποθετείται από 1 ml του δείγματος του ολικού αίματος με αποστειρωμένη πιπέτα σε 4 φρεάτια μιας πλάκας καλλιέργειας 24 φρεατίων. Προστίθενται προσεχτικά 3 σταγόνες από κάθε αντιγόνο στα φρεάτια που περιέχουν το αίμα όπως φαίνεται στο σχήμα 2. Τα αντιγόνα πρέπει να αναμιχθούν εντελώς με το αίμα και για αυτό χρησιμοποιείται αναδευτήρας μικροπλάκας για 1 λεπτό. Οι πλάκες τοποθετούνται για επώαση στους 37° C για 16-24 ώρες σε υγρή ατμόσφαιρα. Στη συνέχεια μεταφέρονται με πιπέτα 200-300 μl πλάσματος, το οποίο βρίσκεται πάνω από το ίζημα που σχηματίζουν τα ερυθρά κύτταρα, σε μια άδεια πλάκα 96 φρεατίων όπως φαίνεται στο σχήμα 3. Το πλάσμα μπορεί να αποθηκευθεί για 28 ημέρες στους 2-8° C ή για τρεις μήνες <20° C.

#### Γ) Στάδιο 2- Παραγωγή ανθρώπινης IFN- γ και μέθοδος ELISA

Η διαδικασία που ακολουθείται σε αυτό το στάδιο είναι ακριβώς ίδια με αυτή που ακολουθείται και στο QuantiFERON –TB Gold in tube assay [251].

**FIGURE 1. Recommended layout for dispensing Blood and Stimulation Antigens into 24 Well Culture Plates**

	Patient Sample Number					
	1	2	3	4	5	6
<b>Nil Control</b> (grey cap)						
<b>ESAT-6</b> (red cap)	●	●	●	●	●	●
<b>CFP-10</b> (white cap)	●	●	●	●	●	●
<b>Mitogen</b> (purple cap)	●	●	●	●	●	●

Σχήμα 2 Τοποθέτηση δειγμάτων και αντιγόνων στις πλάκες καλλιέργειας



Row	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1N	3N	5N	7N	9N			13N	15N	17N	19N	21N
B	1E	3E	5E	7E	9E			13E	15E	17E	19E	21E
C	1C	3C	5C	7C	9C	S2	S3	13C	15C	17C	19C	21C
D	1M	3M	5M	7M	9M	S4	S4	13M	15M	17M	19M	21M
E	2N	4N	6N	8N	10N	11N	12N	14N	16N	18N	20N	22N
F	2E	4E	6E	8E	10E	11E	12E	14E	16E	18E	20E	22E
G	2C	4C	6C	8C	10C	11C	12C	14C	16C	18C	20C	22C
H	2M	4M	6M	8M	10M	11M	12M	14M	16M	18M	20M	22M

Σχήμα 3 Τοποθέτηση πλάσματος σε πλάκα 96 φρεατίων

### 3.2γ Πρωτόκολλο τεχνικής T-SPOT. TB 8

Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για όλα τα ύποπτα για ενεργό ή λανθάνουσα φυματίωση άτομα. Βασίζεται στη χρήση των περιφερικών μονοκυττάρων (peripheral blood mononuclear cells), τα οποία διαχωρίζονται από το ολικό αίμα και στη συνέχεια απαριθμούνται ώστε να είναι σίγουρο ότι ακόμα και για άτομα με λίγα μονοκύτταρα, λόγω προβλήματος του ανοσοποιητικού συστήματος, θα προστεθεί επαρκής αριθμός μονοκυττάρων στα υπό εξέταση φρεάτια με τα αντιγόνα. Για κάθε δείγμα χρειάζονται 4 φρεάτια τα οποία περιέχουν αντιγόνο ESAT6, αντιγόνο CFP10, ένα που θα λειτουργήσει ως θετικό control περιέχει φυτοαιμαγλουτινίνη και θα ελέγξει τη λειτουργικότητα των περιφερικών μονοκυττάρων και ένα nil control που θα αναγνωρίσει την ενεργοποίηση μη ειδικών κυττάρων. Η διαδικασία που πρέπει να ακολουθηθεί είναι η εξής:

#### A) Συλλογή δείγματος και προετοιμασία

Σε ενήλικες και παιδιά άνω των 10 ετών λαμβάνεται αίμα 8 ml, σε παιδιά ηλικίας 2-9 ετών 4 ml και σε παιδιά κάτω των 2 ετών 2 ml με φλεβοκέντηση. Το αίμα δεν πρέπει να καταψυχθεί. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται ώστε να διαχωριστούν τα μονοκύτταρα. Η λευκή νεφώδης μάζα των μονοκυττάρων συλλέγεται με μια πιπέτα και τοποθετείται σε κωνικό φιαλίδιο φυγοκέντρησης όπου προστίθεται μέσο κυτταρικής καλλιέργειας τόσο ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 10 ml. Γίνεται φυγοκέντρηση στους 600xg για 7 λεπτά και αφαιρείται το υπερκείμενο. Στο εναπομείναν τοποθετείται φρέσκο μέσο ώστε ο

τελικός όγκος να είναι 10 ml και φυγοκεντρείται στους 350 xg για 7 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνεται το υπερκείμενο και το εναπομείνον διαλύεται σε 0.7 ml μέσου.

#### B) Μέτρηση των κυττάρων και διάλυση

Για να υπάρξει σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων πρέπει κάθε φρεάτιο της χρησιμοποιούμενης πλάκας να περιέχει  $2.5 \times 10^5$  βιώσιμα μονοκύτταρα. Κάθε υπό εξέταση δείγμα ασθενούς χρειάζεται 4 φρεάτια. Η μέτρηση των κυττάρων γίνεται με αιματοκυτταρομετρητές και το τελικό κυτταρικό διάλυμα που σχηματίζεται πρέπει να περιέχει το σωστό αριθμό μονοκυττάρων.

#### Γ) Προετοιμασία της πλάκας και επώαση

Τοποθετούνται οι ταινίες των 8 φρεατίων στο πλαίσιο μιας πλάκας και εξισορροπούν σε θερμοκρασία δωματίου. Τοποθετούνται 50 ml μέσου κυτταρικής καλλιέργειας σε κάθε ml φρεάτιο, 50 ml διαλύματος θετικού control σε κάθε positive control φρεάτιο και 50 ml διαλύματος αντιγόνων ESAT6 και CFP10 στα αντίστοιχα φρεάτια. Στη συνέχεια τοποθετούνται 100 ml από το τελικό κυτταρικό διάλυμα και η πλάκα επωάζεται στους  $37^{\circ}$  C σε επωαστικό θάλαμο με εφύγρανση και 5%  $\text{CO}_2$  για 16-20 ώρες.

#### Δ) Δημιουργία και μέτρηση κηλίδων (spots)

Η πλάκα απομακρύνεται από τον επωαστικό θάλαμο και αφαιρείται το μέσο κυτταρικής καλλιέργειας. Προστίθενται 200ml διαλύματος PBS σε κάθε φρεάτιο. Η πλύση με PBS επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Στο ενδιάμεσο παράγεται το working strength solution διαλύοντας το συμπυκνωμένο Conjugate Reagent 200 σε διάλυμα PBS. Προστίθενται 50ml από το working strength solution σε κάθε φρεάτιο και γίνεται επώαση στους  $2-8^{\circ}$  C για 1 ώρα. Αφού αφαιρείται ο conjugate γίνονται 4 πλύσεις με διάλυμα PBS. Προστίθενται 50ml από substrate solution και γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 7 λεπτά. Μετά η πλάκα πλένεται προσεχτικά ώστε να σταματήσει η χημική αντίδραση και αφήνεται να στεγνώσει. Τέλος γίνεται η μέτρηση και καταγραφή του αριθμού των ευδιάκριτων σκούρων μπλε κηλίδων που παράγονται στη μεμβράνη κάθε φρεατίου. Ο αριθμός αυτός θα χρησιμοποιηθεί για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

### 3.2δ Πρωτόκολλο τεχνικής T-SPOT. TB 96

Η διαδικασία λειτουργίας του T-SPOT. TB 96 είναι η ίδια ακριβώς με του T-SPOT.TB 8 μόνο που αντί ταινίες των 8 φρεατίων η συσκευασία διαθέτει πλάκα 96 φρεατίων [252].

### 3.3 Ερμηνεία αποτελεσμάτων μεθόδων IGRA

Η διάγνωση ή ο αποκλεισμός της ενεργού φυματίωσης και η εκτίμηση της πιθανότητας της λανθάνουσας φυματίωσης απαιτεί το συνδυασμό επιδημιολογικών, κλινικών, εργαστηριακών και εκ του ιστορικού ευρημάτων. Αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των IGRA.

Τα αποτελέσματα των QuantiFERON- TB Gold και Gold in Tube θεωρούνται **θετικά** όταν η συγκέντρωση της ιντερφερόνης- $\gamma$  σε απάντηση στα αντιγόνα μείον τη συγκέντρωση σε απάντηση στον αρνητικό control είναι  $\geq 0.35$  IU/ml και  $\geq 25\%$  της τιμής του αρνητικού control και η συγκέντρωση της ιντερφερόνης ως απάντηση στον αρνητικό control είναι  $\leq 8$  IU/ml. Τα αποτελέσματα θεωρούνται **αρνητικά** όταν α) η συγκέντρωση της ιντερφερόνης- $\gamma$  σε απάντηση στα αντιγόνα μείον τη συγκέντρωση σε απάντηση στον αρνητικό control είναι  $< 0.35$  IU/ml, η συγκέντρωση της ιντερφερόνης- $\gamma$  σε απάντηση στα μιτογόνα μείον τη συγκέντρωση σε απάντηση στον αρνητικό control είναι  $\geq 0.5$  IU/ml και η συγκέντρωση της ιντερφερόνης ως απάντηση στον αρνητικό control είναι  $\leq 8$  IU/ml, και β) όταν η συγκέντρωση της ιντερφερόνης- $\gamma$  σε απάντηση στα αντιγόνα μείον τη συγκέντρωση σε απάντηση στον αρνητικό control είναι  $\geq 0.35$  IU/ml και  $< 25\%$  της τιμής του αρνητικού control, η συγκέντρωση της ιντερφερόνης- $\gamma$  σε απάντηση στα μιτογόνα μείον τη συγκέντρωση σε απάντηση στον αρνητικό control είναι  $\geq 0.5$  IU/ml και η συγκέντρωση της ιντερφερόνης ως απάντηση στον αρνητικό control είναι  $\leq 8$  IU/ml. **Ενδιάμεσα** θεωρούνται τα αποτελέσματα εφόσον α) η συγκέντρωση της ιντερφερόνης- $\gamma$  σε απάντηση στα μιτογόνα μείον τη συγκέντρωση σε απάντηση στον αρνητικό control είναι  $< 0.5$  IU/ml και η συγκέντρωση της ιντερφερόνης- $\gamma$  σε απάντηση στα αντιγόνα μείον τη συγκέντρωση σε απάντηση στον αρνητικό control είναι  $\geq 0.35$  IU/ml και  $< 25\%$  της τιμής του αρνητικού control ή η συγκέντρωση της ιντερφερόνης- $\gamma$  σε απάντηση στα αντιγόνα μείον τη συγκέντρωση σε απάντηση στον αρνητικό control είναι  $< 0.35$  IU/ml και β) όταν η συγκέντρωση της ιντερφερόνης ως απάντηση στον αρνητικό control είναι  $> 8$

IU/ml ανεξαρτητάς των λοιπών αποτελεσμάτων. Τα παραπάνω φαίνονται συνοπτικά στον πίνακα 11 [250].

Πίνακας 11. Ερμηνεία αποτελεσμάτων QuantiFERON-TB Gold και QuantiFERON-TB Gold in Tube

Nil [IU/ml]	TB Antigen minus Nil [IU/ml]	Mitogen minus Nil [IU/ml]	QuantiFERON-TB [IU/ml]	Report/Interpretation
≤ 8.0	<0.35	≥0.5	Negative	M. tuberculosis infection NOT likely
	≥0.35 and <25% of Nil Value	≥0.5		
	≥0.35 and ≥25% of Nil Value	Any	Positive	M. tuberculosis infection likely
	<0.35	<0.5	Indeterminate	Results are indeterminate for TB- Antigen responsiveness
≥0.35 and <25% of Nil Value	<0.5			
> 8.0	Any	Any		

Όσον αφορά στη μέθοδο T-SPOT. TB ένα τυπικό αποτέλεσμα αναμένεται να περιέχει λίγες ή καθόλου κηλίδες στο αρνητικό control και είκοσι ή παραπάνω κηλίδες στο θετικό control. Αν παρατηρηθούν παραπάνω από 10 κηλίδες (spots) στον αρνητικό Control το αποτέλεσμα θεωρείται ενδιάμεσο (indeterminate). Το αποτέλεσμα θεωρείται **θετικό** εφόσον α) παρατηρούνται λιγότερες από 5 κηλίδες στο φρέαρ του αρνητικού control και στα φρεάτια οποιουδήποτε εκ των αντιγόνων προσμετρούνται 6 κηλίδες παραπάνω από ότι στο αρνητικό control και β) όταν υπάρχουν 6 ή παραπάνω κηλίδες στον αρνητικό control και ταυτόχρονα παρατηρείται το ελάχιστο ο διπλάσιος αριθμός κηλίδων στα αντιγονικά φρεάτια από ότι στα φρεάτια του αρνητικού control. Το αποτέλεσμα θεωρείται **αρνητικό** όταν δεν ισχύουν τα παραπάνω κριτήρια αλλά στο φρέαρ του θετικού control παρατηρούνται πάνω από 20 κηλίδες. **Ενδιάμεσο** θεωρείται το αποτέλεσμα όταν παρατηρούνται 10 ή παραπάνω κηλίδες στον αρνητικό control ή λιγότερες από 20 κηλίδες στο φρέαρ του μιτογόνου [ 252].

Τα ενδιάμεσα αποτελέσματα (indeterminate) στις μεθόδους IGRA δείχνουν ότι η κατάσταση μόλυνσης του ατόμου από μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης δεν μπορεί να καθοριστεί. Είναι σημαντικά αποτελέσματα και δεν σημαίνουν ότι η εξέταση είναι αποτυχημένη. Αν το ενδιάμεσο αποτέλεσμα οφείλεται σε φτωχή απάντηση στο μιτογόνο υπάρχουν δυο εξηγήσεις είτε ότι υπήρξε καθυστερημένη επεξεργασία του δείγματος είτε ότι υπήρξε κάποιο τεχνικό λάθος. Σε αυτή την περίπτωση η μέθοδος πρέπει να επαναληφθεί. Μια επίμονα μειωμένη απάντηση στο μιτογόνο υποδηλώνει την ύπαρξη ανεργίας λόγω ανοσοκαταστολής αν και είναι δυνατόν να συμβεί και σε υγιή άτομα [253]. Σε υγιή, χωρίς ανοσοκαταστολή, άτομα το ποσοστό των ενδιάμεσων αποτελεσμάτων με το QuantiFERON-TB Gold είναι 0-0.3% [250]. Σε μελέτη 318 νοσηλευόμενων οι ασθενείς που ελάμβαναν ανοσοκατασταλτική θεραπεία είχαν 3.5 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης ενδιάμεσων αποτελεσμάτων με τη μέθοδο QFT-Gold από αυτούς που δεν ελάμβαναν τέτοια θεραπεία [253]. Στους ασθενείς με HIV τα ενδιάμεσα αποτελέσματα του QuantiFERON-TB Gold in Tube, λόγω χαμηλής παραγωγής IFN- $\gamma$  ως προς το μιτογόνο, φάνηκε ότι συσχετίζονται με τιμές  $CD4 < 100$  [254] σε αντίθεση με το T-SPOT όπου τα αποτελέσματα ήταν ανεξάρτητα της τιμής των  $CD4$  κυττάρων [255]. Υπάρχουν δυο πιθανές εξηγήσεις για τα παραπάνω αποτελέσματα: είτε ότι με τη τοποθέτηση συγκεκριμένου αριθμού περιφερικών μονοκυττάρων σε κάθε φρεάτιο στη μέθοδο T-SPOT αντισταθμίζεται ο μειωμένος αριθμός  $CD4$  κυττάρων, είτε ότι τα κριτήρια του T-SPOT ως προς τον ορισμό των ενδιάμεσων αποτελεσμάτων είναι λιγότερο αυστηρά. Έρευνες υποστηρίζουν ότι ενδιάμεσα αποτελέσματα είναι σπάνια σε ασθενείς με ρευματολογικά νοσήματα ή σε ασθενείς που λαμβάνουν κορτικοειδή ή άλλα αντιρευματικά φάρμακα καθώς και σε ασθενείς που εφαρμόζουν αιμοκάθαρση και είναι συνήθως ανοσοκατασταλμένοι. Μελέτη των D. Ponce de Leon et al έδειξε ότι από τους 107 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα μόνο οι 2 (1.7%) εμφάνισαν ενδιάμεσα αποτελέσματα με το QuantiFERON-Tb Gold [256]. Παρόμοια ευρήματα παρουσιάζονται στη μελέτη των Takahashi et al όπου μόνο 5% εμφάνισαν ενδιάμεσα αποτελέσματα [257]. Όμως ασθενείς που λαμβάνουν ανταγωνιστές του TNF- $\alpha$  παράγοντα και χημειοθεραπευτικά σκευάσματα εμφανίζουν υψηλό ποσοστό ενδιάμεσων αποτελεσμάτων με τη μέθοδο QuantiFERON-TB Gold [251]. Δύο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι με τη μέθοδο T-SPOT εμφανίζονται λιγότερα ενδιάμεσα αποτελέσματα σε σχέση με την τεχνική QFT-Gold [258,259]. Πρόσφατη μελέτη του Richeldi L et al στην οποία έγινε σύγκριση των TST, T-SPOT και QFT-GIT για τη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης σε ομάδα ανοσοκατασταλμένων

(116 HIV (+), 95 με αιματολογικές κακοήθειες και 120 υποψήφιοι για μεταμόσχευση ήπατος) κατέδειξε ότι τα ενδιάμεσα αποτελέσματα ήταν περισσότερα με τη μέθοδο QFT-IT (7.2%) σε σχέση με το T-SPOT(0.6%) [260].

### 3.4 Ευαισθησία και ειδικότητα μεθόδων IGRA

Η δερμοαντίδραση Mantoux ήταν μέχρι τώρα η μόνη εξέταση για τη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης. Οι δυο όμως μέθοδοι απελευθέρωσης ιντερφερόνης  $\gamma$  (QuantiferON-TB Gold και T-SPOT.TB) έχουν γίνει πλέον εμπορικά διαθέσιμοι και η χρήση τους διαρκώς επεκτείνεται. Ο υπολογισμός της ευαισθησίας και της ειδικότητας των μεθόδων αυτών προσφέρει πολλές χρήσιμες πληροφορίες στους κλινικούς γιατρούς. Σε πρόσφατη ανασκόπηση των Paí M και συνεργατών, συγκεντρώθηκαν 22 μελέτες της QuantiferON-TB Gold μεθόδου αποτελούμενων από 1369 συμμετέχοντες και 13 μελέτες της μεθόδου T-SPOT.TB με 726 συμμετέχοντες προκειμένου να υπολογισθεί η ευαισθησία των παραπάνω μεθόδων. Η συνολική ευαισθησία των 22 μελετών της QuantiferON-TB ήταν 76% (CI, 72-80%). Η συνολική ευαισθησία για το QuantiferON-TB Gold ήταν 78% (CI, 73-82%) και για το QuantiferON-TB Gold in tube ήταν 70% (CI, 63-78%). Η ευαισθησία του T-SPOT.TB ήταν 90% (CI, 86-93%). Στη συνέχεια, συγκεντρώθηκαν 16 μελέτες για το QuantiferON-TB Gold (8 με BCG εμβολιασμένους και 8 με μη εμβολιασμένους) με 1624 συμμετέχοντες συνολικά και 6 μελέτες που χρησιμοποίησαν εμπορικές και μη ELISPOT μεθόδους με συνολικά 290 συμμετέχοντες. Η ολική ειδικότητα του QuantiferON-TB Gold ήταν 98% (CI, 96-99%) και συγκεκριμένα 99% για τους μη εμβολιασμένους (CI, 98-100%) και 96%(CI, 94-98%) για τους εμβολιασμένους. Η ολική ειδικότητα των ELISPOT μεθόδων ήταν 93%(CI, 86-100%). Όταν ελήφθησαν υπόψη μόνο οι 2 μελέτες των εμπορικών T-SPOT.TB η ειδικότητα μειωνόταν στο 87% (CI, 80-92%). Στην ίδια ανασκόπηση έγινε σύγκριση των παραπάνω μεθόδων με την TST. Οι 20 μελέτες με συνολικά 1193 συμμετέχοντες κατέδειξαν ετερογενή αποτελέσματα ως προς την ευαισθησία της TST με συνολική ευαισθησία 77% (CI, 71-82%), η συνολική ειδικότητα μεταξύ των μη εμβολιασμένων με BCG ήταν 97% (CI, 95-99%) ενώ μεταξύ των εμβολιασμένων ήταν χαμηλή και ιδιαίτερα ετερογενής. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την παραπάνω ανασκόπηση είναι ότι οι IGRA έχουν εξαιρετική ειδικότητα, η οποία παραμένει ανεπηρέαστη από τον

εμβολιασμό με BCG. Επίσης, η ολική ευαισθησία του T-SPOT.TB είναι υψηλότερη από των QuantiFERON-TB Gold και QuantiFERON-TB Gold in tube κάνοντας το χρήσιμο στην αξιολόγηση ανοσοκατασταλαμένων πληθυσμών. Τέλος αν και είναι δύσκολη η αξιολόγηση της ευαισθησίας της TST πιθανόν να είναι το ίδιο ευαίσθητη μέθοδος με τις IGRA ενώ η ειδικότητα της είναι χαμηλή στους εμβολιασμένους με BCG μειώνοντας τη χρησιμότητα της [261].

Ενδιαφέρουσα είναι η μελέτη της ευαισθησίας των IGRA σε περιοχές **χαμηλής και υψηλής επιβάρυνσης** σε φυματίωση. Σε ανασκόπηση που έγινε από τους Dheda et al παρατηρήθηκε μειωμένη ευαισθησία του QuantiFERON-TB Gold σε περιοχές με μεγάλη επιβάρυνση σε σχέση με περιοχές με χαμηλή επιβάρυνση. Συγκεκριμένα η ευαισθησία ήταν 69% και 83% αντίστοιχα. Η χαμηλή ευαισθησία σε περιοχές με υψηλό επιπολασμό μπορεί να οφείλεται σε ταυτόχρονη λοίμωξη με HIV, σε προχωρημένη νόσο, σε αστία, στο ανοσολογικό φαινότυπο του ξενιστή ή και στην ποικιλία του μυκοβακτηριδιακού στελέχους [262]. Η παραπάνω ανασκόπηση καταδεικνύει ότι σε περιοχές χαμηλού επιπολασμού οι IGRA είναι το ίδιο ευαίσθητες με την TST, είναι πιο ειδικές σε εμβολιασμένα με BCG άτομα, παρουσιάζουν καλύτερο συσχετισμό με το χρόνο έκθεσης, μπορεί να μεταστραφούν μετά από αντιφυματική θεραπεία και η συμφωνία τους με την TST ποικίλλει ανάλογα με την κατάσταση BCG εμβολιασμού. Σε περιοχές υψηλού επιπολασμού η ευαισθησία των IGRA είναι χαμηλότερη ή ίση με της TST, η ειδικότητα τους είναι υψηλότερη σε εμβολιασμένα άτομα, η συσχέτιση τους με το χρόνο έκθεσης είναι το ίδιο ή λιγότερο καλή με της TST και η συμφωνία των αποτελεσμάτων με αυτών της TST είναι μέτρια προς καλή [261]. Όσον αφορά στα παιδιά φαίνεται ότι σε περιοχές χαμηλού επιπολασμού υπάρχει μέτρια προς φτωχή συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων των IGRA και TST με την πλειοψηφία της ασυμφωνίας να παρατηρείται σε TST (+)/IGRA(-) αποτελέσματα, ενώ σε περιοχές υψηλού επιπολασμού της νόσου υπήρχε πολύ καλή συμφωνία μεταξύ IGRA και TST και ότι η TST παρουσίαζε την ίδια ή μεγαλύτερη ευαισθησία από τις IGRA [262].

Η φυματίωση στα **παιδιά** είναι συνήθως εξωπνευμονική, διάχυτη και ιδιαίτερα σοβαρή ειδικά σε ηλικίες κάτω των 3 ετών και συσχετίζεται με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα [263]. Το ιδανικό κριτήριο για την διάγνωση ενεργού φυματίωσης είναι το άμεσο παρασκεύασμα και η καλλιέργεια υλικών, η λήψη των οποίων είναι δύσκολη στα παιδιά αλλά ακόμα και όταν αυτή καταστεί δυνατή είναι συχνή η πιθανότητα η καλλιέργεια να είναι αρνητική ενώ λιγότερο του 20% των άμεσων παρασκευασμάτων

είναι θετικό [264]. Μέχρι τώρα χρησιμοποιείται μόνο η TST ως υποβοηθητικό εργαλείο στην αξιολόγηση των παιδιών. Μετά τη διάδοση των IGRA η μελέτη της ευαισθησίας και της ειδικότητας των στα παιδιά είναι πολύ σημαντική. Σε ανασκόπηση που έγινε από τους Lalvani A et al παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή ιντερφερόνης- $\gamma$  όπως μετράται με την τεχνική ELISPOT είναι ανεξάρτητη από την ηλικία, με εξαίρεση παρατηρήσεις σε μωρά < 11 εβδομάδων [265]. Σε προοπτική μελέτη στην Ιταλία σε παιδιά ηλικίας < 5 ετών παρατηρήθηκαν περισσότερα ενδιάμεσα αποτελέσματα με την τεχνική ELISA σε σχέση με την ELISPOT (32% και 0% αντίστοιχα) και περισσότερα ενδιάμεσα αποτελέσματα της ELISA σε παιδιά < 5ετών σε σχέση με άτομα ηλικίας > 5 ετών (32% και 10% αντίστοιχα) [256]. Σε αντίθεση σε μελέτη στην Ινδία δεν παρατηρήθηκε κανένα ενδιάμεσο αποτέλεσμα σε 105 παιδιά που εξετάστηκαν με την τεχνική QuantiFERON-TB Gold in tube, δεν παρατηρήθηκε επίδραση του BCG στα αποτελέσματα της TST ή του QuantiFERON, με όριο διαμέτρου τα 10 mm στην TST σημειώθηκε 95% συμφωνία μεταξύ των δυο τεχνικών [266]. Σε προοπτική μελέτη σε 293 παιδιά με φυματίωση στη Νότια Αφρική με υψηλό επιπολασμό σε αστιία και σε λοίμωξη με HIV το ELISPOT παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία από την TST (83% και 63% αντίστοιχα). Η ευαισθησία του ELISPOT σε αντίθεση με αυτή της TST δεν φάνηκε να επηρεάζεται από την ηλικία < 3 ετών, την ταυτόχρονη λοίμωξη με HIV και την αστιία [267]. Σε πρόσφατη μελέτη της τεχνικής ELISA και τα 9 παιδιά που διαγνώστηκαν με ενεργό φυματίωση είχαν θετικά αποτελέσματα καταδεικνύοντας μεγάλη ευαισθησία των μεθόδων ELISA και ELISA in-tube [268]. Σε μελέτη σε σχολείο του Ηνωμένου Βασιλείου με 69 παιδιά με ενεργό φυματίωση και 254 περιπτώσεις λανθάνουσας φυματίωσης παρατηρήθηκε συμφωνία μεταξύ της TST και μη εμπορικής ELISPOT 89%. Η ELISPOT εμφάνισε καλύτερη συσχέτιση με τη διάρκεια και την εγγύτητα της επαφής, ενώ ήταν ανεξάρτητη από τον εμβολιασμό με BCG [269]. Σε έρευνα στη Νιγηρία το ποσοστό των παιδιών με θετική in-tube ELISA και TST ήταν υψηλότερο σε παιδιά που είχαν έρθει σε επαφή με άτομα με θετικό άμεσο παρασκεύασμα στο βάκιλο της φυματίωσης από ότι με αρνητικό άμεσο παρασκεύασμα. Η συμφωνία μεταξύ των 2 μεθόδων ήταν 74% [270]. Αντίθετα από τα παραπάνω, μελέτη 101 παιδιών στην Αυστραλία με υψηλό κίνδυνο λανθάνουσας φυματίωσης τονίζει τη σημαντική έλλειψη συμφωνίας μεταξύ της TST και της μεθόδου IFN-  $\gamma$  με χρήση των αντιγόνων ESAT6 και CFP10 και την εμφάνιση υψηλού ποσοστού (17%) ενδιάμεσων αποτελεσμάτων θέτοντας υπό ερώτηση τη χρησιμότητα των IGRA στα παιδιά με υψηλό κίνδυνο φυματίωσης [267]. Έρευνα στην Αγγλία συμπεριλάμβανε 209



παιδιά για έλεγχο για ενεργό και λανθάνουσα φυματίωση με τις μεθόδους TST, QuantiFERON-TB Gold in-tube και T-SPOT.TB. Στα άτομα με ενεργό φυματίωση η ευαισθησία των παραπάνω μεθόδων ήταν αντίστοιχα 83%, 80% και 58%, δηλαδή οι IGRA δεν ήταν πολύ καλύτερες από την TST αλλά το QuantiFERON-TB Gold in-tube ήταν πιο ευαίσθητο από το T-SPOT.TB. Η συμφωνία μεταξύ των δυο IGRA ήταν φτωχή (66.7%). Στα άτομα με λανθάνουσα φυματίωση η συμφωνία μεταξύ των δυο IGRA ήταν πολύ καλή (92%). Τα συμπεράσματα της παραπάνω μελέτης ήταν ότι δεν υπάρχει λόγος εγκατάλειψης της TST ως διαγνωστικού μέσου για την ενεργό φυματίωση στα παιδιά, ο συνδυασμός χρήσης των TST και IGRA οδηγούσε σε 100% ευαισθησία στο συγκεκριμένο δείγμα και ότι η χρήση των IGRA στη θέση της TST για την ανίχνευση της λανθάνουσας φυματίωσης θα μείωνε τον αριθμό των παιδιών που θα λάμβαναν χημειοπροφύλαξη χωρίς λόγο [271]. Σε μελέτη που έγινε από τους Pavic et al εκτιμήθηκε η απόδοση των IGRA και της TST σε παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών με πρόσφατη επαφή με άτομα που έπασχαν από φυματίωση και διαπιστώθηκε ότι και οι δυο εξετάσεις παρουσιάζουν καλή διαγνωστική ακρίβεια αλλά λόγω της αδικαιολόγητης σημαντικού βαθμού ασυμφωνίας θεωρήθηκε καλύτερη η ταυτόχρονη χρήση και των δυο εξετάσεων σε ηλικίες μικρότερες των πέντε ετών σε πληθυσμούς με υψηλό ρίσκο [272]. Τέλος σε μετα-ανάλυση που πραγματοποιήθηκε από τους Machingaidze S et al εξετάστηκε η χρήση των IGRA σε παιδιά ανοσοεπαρκή για τη διάγνωση τόσο της λανθάνουσας όσο και της ενεργού φυματίωσης. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην ευαισθησία των IGRA και της TST, ενώ σημειώθηκε χαμηλότερη ευαισθησία των IGRA σε περιοχές υψηλού ρίσκου σε σχέση με περιοχές χαμηλού ρίσκου [273].

Αν και έχουν γίνει αρκετές μελέτες για την αποτελεσματικότητα των IGRA για την ανίχνευση της ενεργού φυματίωσης σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες που να αναφέρονται σε **ηλικιωμένους** ασθενείς (> 80 ετών). Έρευνα που έγινε στην Ιαπωνία με έλεγχο 130 ατόμων με ενεργό φυματίωση, 30 ηλικιωμένων και 100 νέων, με τη χρήση TST και QuantiFERON-TB Gold κατέδειξε ότι στους ηλικιωμένους το 27% είχαν θετική TST έναντι του 77% με θετικό QuantiFERON-TB Gold. Συμπερασματικά φαίνεται ότι το QuantiFERON-TB Gold μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο βοηθητικό ανοσολογικό εργαλείο στη διάγνωση της φυματίωσης [274].

Σημαντικό διαγνωστικό και θεραπευτικό πρόβλημα αποτελεί η **εξωπνευμονική φυματίωση** καθώς τα μυκοβακτηρίδια της φυματίωσης μπορεί να βρίσκονται σε μικρό αριθμό και απρόσιτες θέσεις κάνοντας απαραίτητη τη χρήση επεμβατικών τεχνικών. Είναι

λοιπόν σημαντικό να γνωρίζουμε το ρόλο που μπορούν να παίξουν οι IGRA στην ανίχνευση ενεργών περιπτώσεων εξωπνευμονικής φυματίωσης. Μελέτη που έγινε από τους Kobashi et al έδειξε ότι ενώ η ευαισθησία και η ειδικότητα της TST ήταν 57% και 49% αντίστοιχα, η ευαισθησία και η ειδικότητα του QuantiFERON-TB Gold ήταν 86% και 84% αντίστοιχα. Επίσης το QFT είχε μικρότερο ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από την TST. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το QuantiFERON αποτελεί ένα αξιόπιστο διαγνωστικό εργαλείο και πιθανώς πιο χρήσιμο από την TST [275]. Μελέτη των Ravn et al που έγινε με τη χρήση των αντιγόνων ESAT6 και CFP10 και τη μέθοδο ELISA υποστηρίζει ότι η χρήση τους μπορεί να παίξει σπουδαίο βοηθητικό ρόλο στη διάγνωση της εξωπνευμονικής φυματίωσης. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ευαισθησία της μεθόδου σε περιπτώσεις πνευμονικής και εξωπνευμονικής φυματίωσης. Η ευαισθησία ήταν 85% ενώ της άμεσης μικροσκόπησης ήταν 42% και της καλλιέργειας 59%. Επίσης, 87% των ασθενών με αρνητικές καλλιέργεια και μικροσκόπηση βρέθηκαν θετικοί με την ELISA καταδεικνύοντας ότι η ELISA μπορεί να βελτιώσει τη διαγνωστική προσέγγιση της ενεργού φυματίωσης. Στην ίδια εργασία η ειδικότητα της μεθόδου ELISA για την ενεργό φυματίωση ήταν μόνο 60% [276]. Στον αντίποδα μελέτη που έγινε από τους Dewan P et al κατέδειξε χαμηλή ευαισθησία του QFT-G για την ανίχνευση της ενεργού φυματίωσης. Η μέθοδος παρουσίασε 64% ευαισθησία και 89% αρνητική προγνωστική αξία σε άτομα με επιβεβαιωμένη με καλλιέργειες φυματίωση. Επίσης 3 στους 4 (75%) ασθενών με επιβεβαιωμένη εξωπνευμονική φυματίωση εμφάνισαν αρνητικά QuantiFERON-TB Gold αποτελέσματα. Η παραπάνω μελέτη όμως παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα καθώς κάποιοι από τους ασθενείς με αρνητικά QFT-G αποτελέσματα είχαν ήδη λάβει αντιφυματική αγωγή για ποικίλο χρονικό διάστημα, ο αριθμός των εξεταζόμενων ασθενών ήταν μικρός και η TST διενεργήθει σε ορισμένο μόνο αριθμό ατόμων και από διαφορετικούς εξεταστές δυσκολεύοντας τη χρήση της ως συγκριτικής μεθόδου με την IGRA [277].

Η φυματίωση αποτελεί την επικρατέστερη ευκαιριακή λοίμωξη σε ασθενείς με **HIV** και η πορεία της νόσου είναι πολύ επιθετική ακόμα και όταν λαμβάνουν αντιρετροϊκή θεραπεία. Το ποσοστό της μετατροπής από λανθάνουσα σε ενεργό φυματίωση είναι ιδιαίτερα αυξημένο κάνοντας απαραίτητο τον έλεγχο των ασθενών με HIV. Η μέχρι στιγμής χρησιμοποιούμενη μέθοδος Mantoux έχει αρκετά μειονεκτήματα μεταξύ των άλλων τη χαμηλή ευαισθησία σε αυτή την ομάδα ατόμων. Έτσι η μελέτη της χρησιμότητας των IGRA σε αυτή την υποομάδα του πληθυσμού κρίνεται σημαντική. Οι

Aichelburg et al μελέτησαν 830 ασθενείς με HIV χρησιμοποιώντας τη μέθοδο QuantiFERON- TB Gold in tube. Σύμφωνα με την έκθεση τους η ολική ευαισθησία της μεθόδου ήταν 90.9%(95% CI, 62.3%-98.4%). Το ποσοστό των ενδιάμεσων αποτελεσμάτων ήταν μεγαλύτερο σε άτομα με μειωμένα CD4 T-λεμφοκύτταρα κα από τους 822 ασθενείς που εξετάστηκαν σε βάθος χρόνου μόνο 3 με θετικά αποτελέσματα QuantiFERON- TB Gold in tube και κανένας από αυτούς με αρνητικά ή ενδιάμεσα αποτελέσματα εμφάνισαν φυματίωση στα 2 χρόνια της έρευνας. Το τελικό συμπέρασμα της έρευνας ήταν ότι το QuantiFERON- TB Gold in tube μπορεί να αποτελέσει ένα ευαίσθητο εργαλείο στην ανίχνευση της ενεργού φυματίωσης σε ασθενείς με HIV και στην αναγνώριση αυτών με αυξημένο ρίσκο εμφάνισης της [278]. Στη μελέτη των Brock et al εξετάστηκαν 590 ασθενείς με HIV με τη μέθοδο QuantiFERON- TB Gold in tube για λανθάνουσα φυματίωση. Ο επιπολασμός της λανθάνουσας φυματίωσης ήταν 4.6%, 24% του πληθυσμού με CD4 T-λεμφοκύτταρα < 100 είχε ενδιάμεσα αποτελέσματα σε αντίθεση με μόνο 2.8% των ασθενών με CD4 T-λεμφοκύτταρα > 100 καταδεικνύοντας την επίδραση του αριθμού των λεμφοκυττάρων στην παραγωγή ιντερφερόνης-γ. Τέλος, οι ασθενείς με προηγούμενη θεραπεία για φυματίωση είχαν υψηλό ποσοστό θετικών αποτελεσμάτων QIT και όσο πιο πρόσφατη ήταν η θεραπεία τόσο υψηλότερο ήταν το ποσοστό υποδηλώνοντας ότι οι τιμές του QIT μπορεί να μειώνονται με το πέρασμα του χρόνου. Το συμπέρασμα της μελέτης ήταν ότι η μέθοδος QuantiFERON- TB Gold in tube είναι χρήσιμη στην δοκιμασία διαλογής ασθενών με HIV για λανθάνουσα φυματίωση [254]. Σε μελέτη των Dheda K et al εξετάστηκαν 29 ασυμπτωματικοί ασθενείς HIV θετικοί για λανθάνουσα φυματίωση με τη μέθοδο T-SPOT.TB. Το 97% έδωσε αποτιμήσιμα αποτελέσματα χωρίς η απόδοση της μεθόδου να επηρεάζεται από τον αριθμό των CD4 T-λεμφοκυττάρων [279]. Εργασία των Charman AL et al κατέδειξε ότι η μέθοδος T-SPOT.TB έχει χαμηλό ποσοστό αποτυχίας λόγω τεχνικών λαθών και αυξημένη ευαισθησία σε HIV θετικούς ενήλικες και παιδιά με ενεργό φυματίωση ακόμα και αν εμφανίζουν δερματική ανεργία [280]. Στον αντίποδα σε εργασία των Carrara S et al παρατηρήθηκε ότι 25% ασθενών με HIV που εκτιμήθηκαν για ενεργό φυματίωση εμφάνισαν ενδιάμεσα αποτελέσματα με τη χρήση μη εμπορικού ELISPOT [281].

Η μόλυνση **ανοσοκατεσταλμένων ασθενών** με το βάκιλο της φυματίωσης έχει αυξημένο κίνδυνο επανενεργοποίησης της φυματίωσης αλλά η διαχείριση αυτής της υποομάδας του πληθυσμού είναι δύσκολη λόγω του αυξημένου ποσοστού ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων της TST. Μέχρι στιγμής δεν έχουν γίνει αρκετές μελέτες για

την χρησιμότητα των IGRA στην ομάδα των ανοσοκατεσταλμένων. Μελέτη των Richeldi L et al συνέκρινε τις μεθόδους TST, T-SPOT.TB και QuantiFERON-TB Gold in tube στην ανίχνευση λανθάνουσας φυματίωσης σε 116 ασθενείς με HIV, 95 ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες και 120 υποψήφιους για μεταμόσχευση ήπατος. Η TST εμφάνισε λιγότερα θετικά αποτελέσματα (10.9%) σε σχέση με την QuantiFERON-TB Gold in tube (15.1%) και την T-SPOT.TB (18.4%). Η συμφωνία μεταξύ των μεθόδων ήταν μέτρια και μειωμένη στους ασθενείς με HIV. Το συμπέρασμα ήταν ότι οι IGRA αναγνώρισαν μεγαλύτερο αριθμό μολυσμένων με το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης σε σχέση με την TST αλλά ότι χρειάζεται προσοχή στην εφαρμογή τους στους ανοσοκατεσταλμένους [260]. Ενδιαφέρον έχει η μελέτη των Piana F et al που συμπεριλάμβανε 138 ανοσοκατεσταλμένους αιματολογικούς ασθενείς μετά από επαφή με άτομο με φυματίωση και 32 ασθενείς με ανοσοκαταστολή για διαφορετικούς λόγους. Τα ενδιάμεσα αποτελέσματα της μεθόδου T-SPOT.TB ήταν μόνο 4.7% και οι συγγραφείς υποστηρίζουν την χρησιμότητα της μεθόδου σε αυτή την υποομάδα του πληθυσμού [282].

Η φυματίωση σε ασθενείς με **ρευματοειδή αρθρίτιδα**, οι οποίοι λαμβάνουν anti-TNF παράγοντα είναι συχνά αποτέλεσμα επανενεργοποίησης παλιάς μόλυνσης με το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης, καθιστώντας απαραίτητες τη διάγνωση και θεραπεία της λανθάνουσας φυματίωσης. Δεν έχουν γίνει πολλές μελέτες για τη χρησιμότητα των IGRA σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα. Έρευνα των Ponce de Leon D et al περιελάμβανε 101 ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και 93 controls στη Λίμα του Περού, όπου ο επιπολασμός της λανθάνουσας φυματίωσης στο γενικό πληθυσμό είναι 68%. Η μέθοδος QuantiFERON-TB Gold in tube κατέδειξε θετικά αποτελέσματα στο 59.1% των ασθενών με RA και στο 44.6% των controls ενώ η TST έδειξε στο 65.6% και 26.7% αντίστοιχα υποδηλώνοντας, σύμφωνα με τους συγγραφείς, την μεγαλύτερη ευαισθησία της IGRA. Μόνο το 1.9% των ασθενών εμφάνισε ενδιάμεσα αποτελέσματα με την QFT-IT. Τα αποτελέσματα της QFT-IT παρέμειναν ανεπηρέαστα από την ενεργότητα της νόσου και τη χρήση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων. Παρατηρήθηκε ασυμφωνία μεταξύ TST και QFT-IT και συγκεκριμένα TST - / QFT-IT + στο 32.4 των ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και στο 15.6% των controls υποδηλώνοντας τη μεγαλύτερη ευαισθησία της QFT-IT [256].

Πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την επίδραση του **εμβολιασμού με BCG** στα αποτελέσματα των μεθόδων IGRA. Σύμφωνα με την ανασκόπηση των Pai M et al η ειδικότητα των IGRA ήταν μεγαλύτερη συγκρινόμενη με της TST [283]. Οι Lalvani et al ερεύνησαν την πιθανή σχέση του BCG με την ELISPOT (ESAT-6) και την TST σε άτομα

με επαφή με ασθενή με φυματίωση. Η ELISPOT δεν έδειξε καμιά συσχέτιση σε αντίθεση με την TST [284]. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζονται σε εργασία των Ewer K et al σε εκδήλωση επιδημίας φυματίωσης σε σχολείο, όπου η TST εμφάνισε περισσότερα θετικά αποτελέσματα σε BCG εμβολιασμένους ενώ η ELISPOT δεν εμφάνισε κανένα συσχετισμό [269]. Μελέτες των Brock I et al και Johnson PD et al κατέδειξαν ότι η QuantiFERON- TB Gold εμφάνιζε υψηλότερη ειδικότητα σε BCG εμβολιασμένους από ότι η TST [285,286].

Η **εθνότητα** μπορεί να επηρεάζει τα αποτελέσματα των IGRA. Σε εργασία των Chee C et al παρατηρήθηκαν μικρότερη ευαισθησία του QFT-GIT σε Ινδούς από ότι σε Κινέζους (OR 0.27, 95%CI=0.073-0.090, P=0.048) και μικρότερη ευαισθησία του T-SPOT.TB σε ασθενείς από το Malay (OR = 0.23, 95% CI = 0.063 to 0.815, P = 0.023) και την Ινδία (OR = 0.09, 95% CI = 0.017 to 0.429, P = 0.003) σε σχέση με τους Κινέζους. Επίσης ήταν μεγαλύτερη η πιθανότητα εμφάνισης ενδιάμεσων αποτελεσμάτων του QFT-GIT σε ασθενείς από το Malay και την Ινδία σε σύγκριση με τους Κινέζους. Τέλος, σημειώθηκε διαφορετική ποσοτική αντίδραση στα αντιγόνα με τους Κινέζους να εμφανίζουν μεγαλύτερη ποσοτική απάντηση στο ESAT6 αλλά όχι στο CFP10 από ότι οι μη Κινέζικοι πληθυσμοί [287]. Μελέτη των Porsa E et al σε φυλακισμένους ενήλικες στις Ηνωμένες Πολιτείες έδειξε ότι οι Αφροαμερικάνοι παρουσίαζαν περισσότερα TST+/ QFT-αποτελέσματα [288].

Έχουν γίνει μελέτες που ερευνούν τη σχέση των αποτελεσμάτων των IGRA και της TST με το **βαθμό έκθεσης στο μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης**. Όταν λέμε βαθμό έκθεσης εννοούμε το χρόνο έκθεσης και την εγγύτητα σε άτομο που πάσχει από ενεργό φυματίωση. Οι Ewer et al εξέτασαν τη συσχέτιση του ELISPOT και της TST με το βαθμό έκθεσης 535 μαθητών σε σχολείο με εκδήλωση επιδημίας φυματίωσης. Οι μαθητές χωρίστηκαν σε 4 ομάδες ανάλογα με την εγγύτητα επαφής και τη συμμετοχή σε κοινές δραστηριότητες. Η ELISPOT εμφάνισε καλύτερη συσχέτιση με το βαθμό έκθεσης (p=0.03) [268]. Οι Brock et al ερεύνησαν τη παραπάνω συσχέτιση χρησιμοποιώντας QuantiFERON TB Gold in tube και PPD- interferon-gamma assay σε 125 μαθητές στη Δανία. Οι δυο παραπάνω μέθοδοι είχαν παρόμοια συσχέτιση με το βαθμό έκθεσης στους μη εμβολιασμένους με BCG μαθητές αλλά μόνο το QFT-G είχε καλή συσχέτιση στους εμβολιασμένους μαθητές [289]. Οι Lalvani et al συνέκριναν την TST και την ELISPOT (χρησιμοποιώντας το ESAT6) με το βαθμό έκθεσης 50 υγιών ατόμων σε επαφή με άτομο με φυματίωση και διαπίστωσαν ότι το ELISPOT έδειξε ισχυρή θετική ενώ η TST είχε

ασθενή συσχέτιση με το βαθμό έκθεσης [284]. Οι Richeldi et al εξέτασαν 41 νεογνά και 47 ενήλικες μετά από νοσοκομειακή έκθεση σε άτομο με πολυανθεκτική φυματίωση χρησιμοποιώντας την TST και την ELISPOT. Τα αποτελέσματα της ELISPOT συσχετίστηκαν σημαντικά με το βαθμό επαφής (για κάθε ώρα στο ίδιο δωμάτιο με την ασθενή το ποσοστό πιθανότητας θετικού ELISPOT αυξανόταν κατά 1.05) ενώ τα αποτελέσματα της TST δεν συσχετίστηκαν [290].

Ενδιαφέρον έχουν οι μελέτες που εξέτασαν την επίδραση των **άτυπων μυκοβακτηριδίων** στην απόδοση των IGRA και της TST. Οι Lein et al συνέκριναν την TST και ESAT6 και PPD interferon-gamma assay σε ασθενείς με επιβεβαιωμένη με καλλιέργεια λοίμωξη από *M. avium*. Η TST και η μέθοδος παραγωγής ιντερφερόνης- $\gamma$  η βασισμένη στο ESAT6 παρουσίασαν αρνητικά αποτελέσματα σε όλα τα εξεταζόμενα άτομα, εμφανίζοντας, δηλαδή ειδικότητα 100% ενώ η μέθοδος παραγωγής ιντερφερόνης- $\gamma$  η βασιζόμενη στη PPD εμφάνισε ειδικότητα 75% [291]. Σε μια άλλη εργασία με ασθενείς νοσούντες από *M. avium* η μέθοδος παραγωγής ιντερφερόνης- $\gamma$  η βασισμένη στο ESAT6 παρουσίασε 100% ειδικότητα ενώ η Mantoux 60% [292]. Οι Mazurek et al διαπίστωσαν ότι η αντίδραση σε άτυπα μυκοβακτηρίδια μπορεί να είναι υπεύθυνη για το 1/5 των θετικών αποτελεσμάτων της TST σε μη εμβολιασμένα με BCG άτομα με θετική TST και αρνητικά αποτελέσματα της QuantiFERON TB Gold [293]. Οι παραπάνω εργασίες δείχνουν ότι οι IGRA επηρεάζονται λιγότερο από ότι η TST από λοίμωξη από *M. avium* complex. Εργασία των Arend και συνεργατών μελέτησε 12 ασθενείς με *M. kansasii* και *M. marinum* χρησιμοποιώντας μεθόδους παραγωγής ιντερφερόνης  $\gamma$  βασισμένες στα αντιγόνα ESAT6 και CFP10 και την TST. Θετικά αποτελέσματα εμφανίστηκαν σε ποσοστό 75%, 67% και 90% αντίστοιχα αποδεικνύοντας ότι οι απαντήσεις των T-λεμφοκυττάρων στα αντιγόνα ESAT6 και CFP10 δεν είναι ειδικές για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης αλλά μπορεί να οφείλονται και στα *M. kansasii* και *M. marinum* [294]. Υπάρχουν, επίσης, περιορισμένα δεδομένα ότι τα αντιγόνα ESAT6 και CFP10 μπορεί να βρίσκονται και στο *M. leprae* [295], χωρίς όμως να υπάρχουν στοιχεία πως αυτό επηρεάζει την ειδικότητα των IGRA σε περιοχές όπου η λέπρα είναι ενδημική.

### 3.5 Φαινόμενο ενίσχυσης (boosting effect)

Το φαινόμενο ενίσχυσης (boosting effect) αναφέρεται στη διέγερση μιας γηρασμένης ανοσολογικής απάντησης σε ένα αντιγόνο. Σήμερα για τον έλεγχο για λανθάνουσα φυματίωση μπορούν να χρησιμοποιηθούν η TST και οι IGRA. Υπάρχουν, όμως, αποκλίνουσες απόψεις για την ακριβή χρήση τους. Οι Αμερικάνικες οδηγίες (U.S Centers for Disease Control and Prevention) συνιστούν την αντικατάσταση της TST από τις IGRA ενώ οι Αγγλικές (U.K.-based National Institute for Health and Clinical Excellence) και οι Καναδικές οδηγίες συνιστούν τον έλεγχο σε δυο βήματα: Αρχικά να γίνεται Mantoux και στη συνέχεια σε μια περίοδο μέχρι έξι εβδομάδες μετά να γίνονται οι IGRA. Επειδή η PPD RT-23 που χρησιμοποιείται στην TST περιέχει πολλά αντιγόνα, συμπεριλαμβανομένων και των ESAT6 και CFP10 που χρησιμοποιούνται στις IGRA, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η εφαρμογή της TST πριν από τις IGRA θα ήταν δυνατόν να προκαλέσει «φαινόμενο ενίσχυσης» προκαλώντας ψευδώς θετικά αποτελέσματα IGRA [296]. Έχουν γίνει μελέτες για την πρόκληση ή όχι του φαινομένου ενίσχυσης από τη χρήση της TST αλλά τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα. Ορισμένες μελέτες αποδεικνύουν ότι αναπτύσσεται το φαινόμενο [ 297-300], ενώ σε άλλες δεν αναπτύσσεται το φαινόμενο [301-303]. Αυτές οι διαφορές μπορεί να οφείλονται στις διαφορετικές χρονικές περιόδους που εφαρμόστηκαν οι TST και οι IGRA στις διάφορες εργασίες, στο ότι σε ορισμένες χρησιμοποιήθηκαν μη εμπορικά είδη IGRA ή παλαιότερες μορφές αυτών, ορισμένες εργασίες ήταν αναδρομικές και το boosting effect δεν ήταν το προκαθορισμένο τελικό σημείο. Επίσης, οι παραπάνω εργασίες έγιναν σε διαφορετικά περιβάλλοντα έκθεσης και ορισμένες δεν εξέτασαν άτομα με IGRA -/ TST -. Οι van Zyl-Smit et al μελέτησαν 26 Νότιο-Αφρικανούς ιατρούς, φοιτητές ιατρικής και εθελοντές με διαφορετικό βαθμό έκθεσης στη φυματίωση χρησιμοποιώντας Mantoux, T.SPOT-TB, QuantiFERON-TB Gold in tube και heparin-binding hemagglutinin. Όλες οι παραπάνω μέθοδοι εφαρμόστηκαν 21, 14, 7 μέρες πριν εφαρμοστεί η Mantoux, την ίδια μέρα με την Mantoux, και 3, 7, 28 και 84 μέρες μετά την εφαρμογή της Mantoux. Τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης κατέδειξαν την ανάπτυξη βραχυπρόθεσμης μεταβλητότητας και στις δυο IGRA. Οι απαντήσεις που βρίσκονται σε οριακά σημεία (cut-off points) εμφάνισαν μεγαλύτερη πιθανότητα για μεταστροφές λόγω αυτής της μεταβλητότητας. Τόσο με τη χρήση του QuantiFERON-TB Gold in tube όσο και με τη χρήση του T.SPOT-TB επτά μέρες μετά την εφαρμογή της TST εμφανίστηκε το «φαινόμενο ενίσχυσης», το

οποίο σε ορισμένους ασθενείς διατηρήθηκε και για τρεις μήνες μετά. Αντίθετα, με την εφαρμογή των μεθόδων τρεις μέρες μετά την TST δεν παρουσιάστηκε boosting effect θέτοντας αυτό το χρονικό όριο ως ασφαλές για τη χρήση των IGRA στον έλεγχο των «δύο βημάτων»(two step screening). Το boosting effect ήταν πιο συχνό σε άτομα με αρχικά θετικά αποτελέσματα IGRA. Οι πληροφορίες από αυτή τη μελέτη προτείνουν ότι η απόκλιση γύρω από το οριακό σημείο, δηλαδή τιμές 0.2-0.7 IU/ml για το QuantiFERON-TB Gold in tube και 4-8 spots για το T.SPOT-TB αποτελούν μια οριακή ζώνη (borderline zone) και οι τιμές σε αυτή πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή. Έχει προταθεί η δημιουργία μιας «ζώνης αμφιβολίας»(uncertainty zone) κατά την ανάλυση των επαναλαμβανόμενων εξετάσεων IGRA [304]. Με τα ευρήματα τους οι van Zyl-Smit et al υποστηρίζουν την άποψη των Pai M et al ότι για να οριστεί η μεταστροφή θα πρέπει εκτός από την αλλαγή του αποτελέσματος από αρνητικό σε θετικό το όριο για το QFT-GIT να είναι μεγαλύτερο πχ. 0.7 IU/ml [ 305]. Επίσης, προτείνουν για το όριο μεταστροφής του T.SPOT-TB την τιμή των 9 spots ή παραπάνω. Με παρόμοιο τρόπο προτείνουν ότι πρέπει να οριστούν όρια για τον ορισμό του « φαινομένου ενίσχυσης»[296].

Σε μελέτη των Leyten EMS et al εφαρμόστηκε το QuantiFERON-TB Gold in tube την ημέρα εφαρμογής της TST και την ημέρα της ανάγνωσης της (δηλαδή τρεις μέρες μετά) σε 15 TST αρνητικά άτομα, σε 46 TST θετικά άτομα με παλιά ή πρόσφατη έκθεση σε φυματίωση και σε 5 θεραπευμένους συμμετέχοντες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα σε κανέναν TST αρνητικό δεν παρατηρήθηκε «φαινόμενο ενίσχυσης», ενώ σε λίγα αρχικά TST θετικά άτομα η TST ενίσχυσε τα αποτελέσματα του QFT-GIT. Σύμφωνα με την άποψη των συγγραφέων το boosting effect ήταν τόσο σπάνιο, που δεν έθετε σε κίνδυνο την ειδικότητα του QFT-GIT για την ανίχνευση της λανθάνουσας φυματίωσης. Βέβαια η παραπάνω εργασία παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς: ο αριθμός των εξεταζόμενων είναι μικρός και η επαναληπτική εφαρμογή του QFT-GIT έγινε μόνο 3 μέρες μετά την εφαρμογή της TST, έτσι δεν γνωρίζουμε αν γινόταν μεταγενέστερα αν εμφανιζόταν «φαινόμενο ενίσχυσης» ή όχι [302].

Σε εργασία των Richeldi L et al 44 άτομα εξετάστηκαν 3 μήνες μετά την πιθανή επαφή τους με άτομο με πολυανθεκτική φυματίωση με χρήση ELISPOT δυο ώρες πριν την εφαρμογή της TST. Οι TST και ELISPOT πραγματοποιήθηκαν εκ νέου σε 9, 15 και 24 μήνες από το χρόνο πιθανής έκθεσης. Εικοσιτέσσερις μήνες μετά και τα 44 άτομα παρέμειναν ELISPOT αρνητικά ενώ τρία από αρνητικά έγιναν TST θετικά. Τα παραπάνω



αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η μέθοδος ELISPOT μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με την TST χωρίς να επηρεάζεται η ειδικότητα της [301].

### **3.6 Η επίπτωση της αντιφυματικής θεραπείας στα αποτελέσματα των δοκιμασιών απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ**

Αρκετές μελέτες έχουν αξιολογήσει την επίδραση της αντιφυματικής θεραπείας στα αποτελέσματα των δοκιμασιών απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ [283]. Ορισμένες κατέδειξαν ότι η απάντηση της ιντερφερόνης-γ στο ESAT6 μειωνόταν με την εφαρμογή θεραπείας σε άτομα με ενεργό φυματίωση [306-308]. Άλλες έδειξαν ότι η απάντηση στο ESAT6 αυξανόταν μετά τη θεραπεία [309,310] και άλλες ότι η θεραπεία για ενεργό φυματίωση δεν επηρέαζε καθόλου τις απαντήσεις του QuantiFERON-TB assay [311,312] και μιας μη εμπορικής μεθόδου βασισμένης στο ESAT6 [313]. Πρόσφατη μελέτη των Sauzullo et al περιελάμβανε 38 ασθενείς με ενεργό φυματίωση, οι οποίοι ελέγχθηκαν με τη χρήση του QuantiFERON TB Gold στην αρχή της αντιφυματικής θεραπείας, στους 2, 4 και 6 μήνες. Όλοι έλαβαν τετραπλή αντιφυματική θεραπεία. Μετά από 2 μήνες θεραπείας το 81.5% των ασθενών είχαν θετικά αποτελέσματα QuantiFERON TB Gold, στους 4 μήνες είχε το 57.8% ενώ με τη λήξη της θεραπείας το 71% των ασθενών εμφάνισε αναστροφή (reversion) του αποτελέσματος του QFT-G από θετικό σε αρνητικό ενώ το 29% των ασθενών συνέχισε να παρουσιάζει θετικά αποτελέσματα. Από τους 27 που παρουσίασαν αναστροφή όλοι είχαν πλήρη κλινική και μικροβιολογική ανάρρωση. Σε αυτούς τους ασθενείς η απελευθέρωση της ιντερφερόνης-γ ήταν απύσχα ακόμα και μετά από παρατεταμένη εξαήμερη επώαση με τα αντιγόνα ESAT6 και CFP10 ενώ το ποσοστό των ενεργών T κυττάρων/ T κυττάρων μνήμης ήταν χαμηλότερο σε σχέση με τους ασθενείς που συνέχιζαν να εμφανίζουν θετικά QFT-G αποτελέσματα. Σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν μόνο στο ποσοστό των CD8 T-κυττάρων μνήμης μεταξύ των δυο ομάδων ασθενών. Από τα άτομα με τα εμμένοντα θετικά QFT-G αποτελέσματα το 54% παρουσίαζαν πλήρη απάντηση στη θεραπεία ενώ το 46% δεν εμφάνισε λύση της φυματίωσης. Τέλος, έγινε έλεγχος αν η αντιφυματική θεραπεία έχει ανασταλτικό ρόλο στην απελευθέρωση της ιντερφερόνης-γ από τα T- κύτταρα, με την επώαση των δειγμάτων αίματος με τον συνδυασμό των αντιφυματικών φαρμάκων. Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στην παραγωγή της ιντερφερόνης- γ όταν οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων

αντιστοιχούσαν σε αυτές που παρατηρούνται στον ορό των ασθενών υπό θεραπεία. Το τελικό συμπέρασμα των συγγραφέων ήταν ότι η μείωση της απάντησης των ειδικών, για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης, T-κυττάρων μπορεί να αποτελέσει ένα συμπληρωματικό εργαλείο στον έλεγχο της δραστηριότητας της αντιφυματικής θεραπείας και ότι η τελευταία δεν παίζει αρνητικό ρυθμιστικό ρόλο στην παραγωγή της ιντερφερόνης- $\gamma$  [314].

Σε άλλη πρόσφατη μελέτη των Ribeiro S et al εξετάστηκαν 58 ασθενείς, οι οποίοι ελάμβαναν δυο διαφορετικά τετραπλά θεραπευτικά σχήματα, με το T-SPOT.TB πριν την έναρξη της θεραπείας και 8 και 24 εβδομάδες μετά την έναρξη της. Μόνο το 10% των ασθενών που είχαν οριακά θετικά αποτελέσματα τα μετέτρεψαν σε αρνητικά στο τέλος της 24<sup>ης</sup> εβδομάδας θεραπείας. Τα αποτελέσματα (μέτρηση Spot forming cells) ήταν πιο έντονα θετικά στα άτομα με εμμένουσα θετική καλλιέργεια μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας παρά στα άτομα με αρνητική καλλιέργεια. Οι συγγραφείς θεωρούν ότι η διακύμανση των αποτελεσμάτων στους ίδιους ασθενείς μαζί με την αδυναμία αρνητικοποίησης των αποτελεσμάτων μετά το τέλος της θεραπείας στο μεγαλύτερο ποσοστό μπορεί να περιορίσει τη χρήση του T-SPOT.TB ως συμπληρωματικό εργαλείο στον έλεγχο της δραστηριότητας της αντιφυματικής θεραπείας. Η παραπάνω μελέτη παρουσιάζει ορισμένους περιορισμούς: χρησιμοποιήθηκαν κατεψυγμένα T-κύτταρα, γεγονός που μπορεί να μείωσε τη δραστηριότητα τους και επίσης έγινε η σύγκριση του T-SPOT.TB με την καλλιέργεια μετά από 8 εβδομάδες θεραπείας και όχι στο τέλος της [315].

Αντίθετα, οι Aiken et al καταδεικνύουν ότι το 55% των θεραπευμένων παρουσίαζε αρνητικοποίηση των αποτελεσμάτων του ELISPOT ένα χρόνο μετά την έναρξη της θεραπείας [316].

Οι Carrara et al μελέτησαν 18 ασθενείς με ενεργό φυματίωση, που ελάμβαναν τετραπλή αντιφυματική θεραπεία, με τη χρήση της μεθόδου ELISPOT και αντιγόνο το ESAT6, κατά τη διάγνωση και τρεις μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας. Όλοι εμφάνιζαν θετικά αποτελέσματα κατά τη διάγνωση αλλά τρεις μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας μόνο το 28% παρουσίαζε απάντηση στο αντιγόνο ESAT6. Ήταν τα άτομα που δεν παρουσίαζαν κλινική ή μικροβιολογική βελτίωση. Οι συγγραφείς θεωρούν ότι η παραπάνω μέθοδος είναι ένα χρήσιμο εργαλείο για τον έλεγχο δραστηριότητας της θεραπείας [305].

Οι Kobashi et al χρησιμοποίησαν τις μεθόδους QuantiFERON TB-2G (QFT-2G) και T-SPOT.TB για να παρακολουθήσουν τη λειτουργικότητα της αντιφυματικής θεραπείας σε 40 ασθενείς με ενεργό φυματίωση και υπό θεραπεία. Οι μετρήσεις έγιναν κατά την έναρξη της θεραπείας και 3, 6, 9, 12 μήνες μετά την έναρξη. Τα θετικά αποτελέσματα της QFT-2G έπεσαν από το 83% στο 58% μετά τη λήξη της θεραπείας ενώ στην T-SPOT.TB έπεσαν από το 90% στο 63%. Και με τις δύο μεθόδους παρατηρήθηκε μείωση της τιμής της παραγόμενης ιντερφερόνης- $\gamma$  σε αντίδραση στο αντιγόνο CFP10. Με βάση τα παραπάνω στοιχεία οι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι οι IGRA είναι πιθανόν χρήσιμες για την παρακολούθηση της θεραπείας αλλά πρέπει τα αποτελέσματα να εξετάζονται με προσοχή λόγω του απαιτούμενου χρόνου για τη μετατροπή τους [317].

Σε μια εργασία των Ulrichs et al παρατηρήθηκε αύξηση των κυττάρων που παράγουν ιντερφερόνη- $\gamma$  μετά την αντίδραση με το αντιγόνο ESAT6 κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας. Συγκεκριμένα η παραπάνω ομάδα εξέτασε 19 υγιείς εθελοντές και 31 ασθενείς με ενεργό φυματίωση 5 μέρες πριν την έναρξη αντιφυματικής αγωγής και 60 ημέρες μετά την έναρξη της, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ELISPOT. Παρατήρησαν αύξηση των παραγόμενων ιντερφερόνη- $\gamma$  T κύτταρων έναντι του ESAT6 σε 9/10 ασθενείς μετά από 60 ημέρες αντιφυματικής αγωγής και συσχέτισαν τα παραπάνω αποτελέσματα με βελτίωση της ανοσίας λόγω της αγωγής [310].

### **3.7 Επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$**

Λίγες μελέτες παρέχουν πληροφορίες για την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$ . Τα αποτελέσματα δυο μελετών με τη χρήση της μεθόδου QuantiFERON TB Gold σε 562 στρατιώτες με διαφορά ενός μηνός έδειξε συμφωνία σε ποσοστό 99.3% [318].

Σε πρόσφατη μελέτη των Detjen AK et al ελέγχθηκε η επαναληψιμότητα του QuantiFERON TB Gold in tube σε 27 υγιείς εργαζόμενους στον τομέα υγείας. Ελέγχθηκε η διακύμανση των αποτελεσμάτων της μεθόδου ανάμεσα στις διαφορετικές μέρες εφαρμογής της, στο διαφορετικό τρόπο διατήρησης των δειγμάτων αίματος, στη λήψη και στο χειρισμό των δειγμάτων από διαφορετικά άτομα. Η συμφωνία των αποτελεσμάτων σε όλες τις παραπάνω εξεταζόμενες παραμέτρους ήταν πολύ υψηλή με τιμές kappa 0.82-1.00.

Σύμφωνα με τους συγγραφείς το QuantiFERON TB Gold in tube αποτελεί μια ικανοποιητική μέθοδο με υψηλή επαναληψιμότητα, αν και η μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων που μπορεί να παρατηρηθεί στον ίδιο ασθενή μπορεί να επηρεάσει την ερμηνεία τους σε διαδοχικές εξετάσεις [319].

Στην εργασία των Belle et al εξετάστηκαν 253 εθελοντές από την Αιθιοπία και 175 εθελοντές από τη Βαλτιμόρη με τη χρήση των μεθόδων Mantoux και QuantiFERON TB Gold. Από αυτούς στους 11 τα τεστ έγιναν δυο φορές. Τα αποτελέσματα της IGRA άλλαξαν στους έξι από τους έντεκα εθελοντές. Από τα επτά άτομα με ενδιάμεσο παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση φυματίωσης, στα οποία έγιναν επαναληπτικά τέστ τα αποτελέσματα της Mantoux άλλαξαν μόνο σε έναν, ενώ τα αποτελέσματα της QuantiFERON TB Gold ήταν διαφορετικά για τρεις εθελοντές, υπονοώντας χαμηλή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων της QuantiFERON TB Gold. Ένα από τα μειονεκτήματα της εργασίας είναι ο χαμηλός αριθμός συμμετεχόντων στη διπλή εξέταση [320].

Οι κατασκευαστές του T-SPOT.TB αναφέρουν επαναληψιμότητα της μεθόδου 97.9% [321].

### **3.8 Εφαρμογή των δοκιμασιών απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$ σε περιπτώσεις πνευμονικής και εξωπνευμονικής φυματίωσης**

#### **3.8.1 Εφαρμογή των IGRA στο πλευριτικό υγρό**

Οι φυματιώδεις πλευριτικές συλλογές αποτελούν τη δεύτερη κυριότερη μορφή εξωπνευμονικής φυματίωσης και μπορεί να είναι πρωτοπαθής ή λόγω επανενεργοποίησης. Το πλευριτικό υγρό είναι φτωχό σε μυκοβακτηρίδια της φυματίωσης κάνοντας τη διάγνωση της δύσκολη. Οι ευαισθησίες των μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενων μεθόδων διάγνωσης είναι σχετικά χαμηλές: το άμεσο παρασκεύασμα έχει ευαισθησία <5%, η καλλιέργεια πλευριτικού υγρού 20-60%, οι τεχνικές ενίσχυσης νουκλειικών οξέων 61%, η διαδερμική βιοψία: 60-80% ενώ η βιοψία μέσω θωρακοσκόπησης 90-100%. Από τις μη επεμβατικές μεθόδους η ADA έχει συνολική ευαισθησία 92%(56-100%) και η μη διεγερμένη παραγωγή ιντερφερόνης- $\gamma$  89% (64-100%). Στην προσπάθεια βελτίωσης της διάγνωσης της φυματιώδους υπεζωκοτικής συλλογής ερευνήθηκε ο ρόλος των IGRA [322].

Σε μελέτη των Ariga et al εξετάστηκαν 75 ασθενείς με διαφορετικής αιτιολογίας συλλογές. Διάγνωση φυματίωσης έγινε στους 28 με τη χρήση καλλιέργειας πλευριτικού υγρού ή βιοπτικού υλικού. Επίσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος QuantiFERON TB Gold σε αίμα και σε πλευριτικό υγρό και διαπιστώθηκε ότι η τελευταία εμφάνιζε μεγαλύτερη διαγνωστική ακρίβεια από την ADA, από τη μη διεγερμένη IFN- $\gamma$  και από την QuantiFERON TB Gold στο αίμα. Συγκεκριμένα η ευαισθησία της μεθόδου στο αίμα ήταν 77.8% και η ειδικότητα 70.2% ενώ στο πλευριτικό υγρό ήταν αντίστοιχα 96.4% και 97.8% [323].

Οι Losi et al μελέτησαν 41 ασθενείς με ετερόπλευρη πλευριτική συλλογή. Η επιβεβαίωση της φυματιώδους αιτιολογίας έγινε με τη χρήση καλλιέργειών και PCR. Εφαρμόστηκε η μέθοδος ELISPOT στο αίμα και στο πλευριτικό υγρό και το όριο (cut-off) για το θετικό αποτέλεσμα καθορίστηκε να είναι το ίδιο και στα δυο υγρά. Η ολική ευαισθησία και ειδικότητα για το αίμα ήταν 90% και 67% και για το πλευριτικό υγρό ήταν αντίστοιχα 95% και 76%. Δεν υπήρχαν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα στο αίμα ή στο πλευριτικό υγρό στους ασθενείς με τη σίγουρη διάγνωση φυματίωσης ενώ στην ομάδα των ασθενών με την πιθανολογούμενη φυματίωση βρέθηκαν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε 2 από τα 10 δείγματα στο αίμα και σε 1 από τα 10 στο πλευριτικό υγρό. Ψευδώς θετικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στο 33% των δειγμάτων αίματος και στο 24% του πλευριτικού υγρού [324].

Στις παραπάνω δυο εργασίες, οι οποίες έλαβαν χώρα σε περιοχές με χαμηλό επιπολασμό σε φυματίωση φάνηκε ότι οι μέθοδοι IGRA στο πλευριτικό υγρό εμφανίζουν μεγαλύτερη διαγνωστική ακρίβεια από ότι όταν εφαρμόζονται στο περιφερικό αίμα. Το αντίστροφο παρατηρήθηκε σε εργασίες που έγιναν σε περιοχές με υψηλό επιπολασμό σε φυματίωση.

Η μελέτη των Baba et al κατηγοριοποιεί 34 ασθενείς από τη Νότια Αφρική με πλευριτική συλλογή σε ασθενείς με σίγουρη και πιθανολογούμενη φυματίωση και πλευριτική συλλογή άλλης αιτιολογίας. Χρησιμοποιήθηκε το QuantiFERON TB Gold in tube στο αίμα και στο πλευριτικό υγρό. Το 74% των ασθενών ήταν θετικοί στον HIV. Η συνολική ευαισθησία της μεθόδου στο αίμα ήταν 71% και στο πλευριτικό υγρό 44% και η ειδικότητα ήταν 100% και 60% αντίστοιχα. Τα ενδιάμεσα αποτελέσματα ήταν 25% στο αίμα (πιθανώς λόγω της χαμηλής παραγωγής ιντερφερόνης- $\gamma$  εξαιτίας του χαμηλού αριθμού CD4 λεμφοκυττάρων) και 52% στο πλευριτικό υγρό (πιθανώς λόγω των

αυξημένων επιπέδων ιντερφερόνης- $\gamma$  στα άτομα της ομάδας ελέγχου με αρνητική TST) [325].

Σύμφωνα με τους Hooper et al η χρήση των IGRA στο αίμα και ακόμα περισσότερο στο πλευριτικό υγρό, σε περιοχές με χαμηλό επιπολασμό φυματίωσης, εμφανίζει χαμηλό ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων (όσον αφορά στο πλευριτικό υγρό αυτό μπορεί να οφείλεται στη διαμερισματοποίηση των ευαισθητοποιημένων T-λεμφοκυττάρων στην υπεζωκοτική κοιλότητα). Λόγω όμως του επίσης χαμηλού ποσοστού παρόμοιων αποτελεσμάτων με την ADA και τη μη διεγερμένη IFN- $\gamma$  πιθανόν οι IGRA να μην προσφέρουν κάτι επιπρόσθετο σε περιοχές που οι παραπάνω μέθοδοι χρησιμοποιούνται. Όσον αφορά σε περιοχές με υψηλό επιπολασμό φυματίωσης ή τη συνύπαρξη μεγάλου ποσοστού HIV θετικών ατόμων φαίνεται ότι η ευαισθησία των IGRA περιορίζεται και τα ενδιάμεσα αποτελέσματα είναι αρκετά [322].

Οι Chegou et al εξέτασαν 66 ασθενείς με άγνωστη αιτιολογία υπεζωκοτική συλλογή. Το συμπέρασμα της μελέτης τους ήταν ότι η ex vivo μέτρηση της παραγόμενης ιντερφερόνης- $\gamma$  αναγνώρισε με ακρίβεια όλα τα άτομα που έπασχαν από φυματίωση και ήταν ανώτερη σε σχέση με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο QuantiFERON TB Gold in tube στο αίμα και στο πλευριτικό υγρό. Η ευαισθησία και η ειδικότητα για αυτές τις τρεις μεθόδους ήταν αντίστοιχα 100%, 73%, 57% και 67%, 71%, 87%. Με βάση τα δεδομένα τους οι συγγραφείς θεωρούν ότι η QuantiFERON TB Gold in tube δεν προσφέρει επιπρόσθετα πλεονεκτήματα στη διάγνωση της φυματιώδους υπεζωκοτικής συλλογής [326].

### 3.8.2 Εφαρμογή των IGRA στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL)

Παρά τη συνεχή βελτίωση των διαγνωστικών μεθόδων η γρήγορη διάγνωση της πνευμονικής φυματίωσης παραμένει δύσκολη σε ορισμένες περιπτώσεις. Η καλλιέργεια υλικών αποτελεί τον χρυσό κανόνα για τη διάγνωση αλλά ο χρόνος που απαιτείται για τη λήψη των αποτελεσμάτων και η ευαισθησία της μεθόδου που κυμαίνεται γύρω στο 80% αποτελούν μειονεκτήματα. Στην προσπάθεια να αξιολογηθεί ο ρόλος της μεθόδου ELISPOT στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) στη διάγνωση της φυματίωσης σε άτομα με άμεσο παρασκεύασμα αρνητικό (σε περιοχές με χαμηλό επιπολασμό φυματίωσης) έγινε από τους Jafari et al μια πολυκεντρική μελέτη στην οποία συμμετείχαν 347 με ενεργό φυματίωση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης η ευαισθησία και η ειδικότητα του BAL ELISPOT ήταν 91% και 80% αντίστοιχα. Σε αντίθεση με τα

αποτελέσματα του ELISPOT στο αίμα, στο BAL δεν υπήρχε επίδραση από ιστορικό προηγούμενης νόσησης από ενεργό φυματίωση. Συγκρινόμενο με την TST, με την ELISPOT στο αίμα και τη τεχνική ενίσχυσης νουκλεικών οξέων (nucleic acid amplification technique) στο BAL η μέθοδος ELISPOT στο BAL αποδείχθηκε ανώτερη και πιο ευαίσθητη στον προσδιορισμό των ατόμων με φυματίωση και αρνητικό άμεσο παρασκεύασμα. Το συμπέρασμα των συγγραφέων είναι ότι η μέθοδος BAL ELISPOT αποτελεί σημαντική πρόοδο στη διαφορική διάγνωση μεταξύ φυματίωσης με αρνητικό άμεσο παρασκεύασμα και λανθάνουσας φυματίωσης αν και η ειδικότητα της είναι κατώτερη από της τεχνικής ενίσχυσης νουκλεικών οξέων [327].

Σε άλλη μελέτη των Jafari et al εξετάστηκαν με τη μέθοδο T-SPOT.TB 37 ασθενείς από τους οποίους οι 12 διεγνώσθησαν με πνευμονική φυματίωση. Οι ασθενείς με φυματίωση είχαν κατά μέσο όρο 17 κύτταρα ειδικά έναντι του ESAT6 και 24.5 έναντι του CFP10 / 200.000 περιφερικά μονοκύτταρα και 37.5 κύτταρα ειδικά έναντι του ESAT6 και 49.5 έναντι του CFP10 / 200.000 κύτταρα του BAL. Οι ασθενείς με διαφορετική διάγνωση είχαν 1 κύτταρο ειδικό έναντι του ESAT6 και 1 έναντι του CFP10 / 200.000 περιφερικά μονοκύτταρα και κανένα κύτταρο ειδικό έναντι του ESAT6 και έναντι του CFP10 / 200.000 κύτταρα του BAL. Στη συγκεκριμένη εργασία παρατηρήθηκε απάντηση των κυττάρων του BAL έναντι των ESAT6 και CFP10 μόνο στους ασθενείς με ενεργό φυματίωση και όχι σε αυτούς με λανθάνουσα φυματίωση, ιστορικό παλιάς φυματίωσης ή πνευμονικά διηθήματα διαφορετικής αιτιολογίας. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου BAL ELISPOT σε αυτή τη μικρή ομάδα των ατόμων ήταν 100% (95% CI, 0.97-1.0) [328].

Σε μελέτη περίπτωσης ασθενούς από τους Strassburg A et al εξετάστηκε ασθενής, ο οποίος ελάμβανε ανοσοκατασταλτική θεραπεία οχτώ μήνες για μικτή νόσο του συνδετικού ιστού. Τα αποτελέσματα της μεθόδου QuantiFERON TB Gold in tube στο περιφερικό αίμα ήταν εντόνως θετικά υποδεικνύοντας παλαιά, λανθάνουσα ή ενεργό φυματίωση. Η TST ήταν 0mm, ενώ το άμεσο παρασκεύασμα και η τεχνική ενίσχυσης νουκλεικών οξέων στα πτύελα ήταν αρνητικές. Το BAL και η διαβρογχική βιοψία που ελήφθησαν δεν ήταν ειδικά για τη διάγνωση της φυματίωσης. Έτσι εφαρμόστηκε η μέθοδος T-SPOT.TB στο αίμα και στο BAL, τα αποτελέσματα των οποίων ήταν εντόνως ενδεικτικά υπέρ της πνευμονικής φυματίωσης. Πράγματι 18 ημέρες αργότερα η καλλιέργεια των πτυέλων ήταν θετική για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Σύμφωνα με τα παραπάνω οι συγγραφείς θεωρούν ότι η εφαρμογή της μεθόδου T-SPOT.TB στο BAL αποτελεί ένα πολλά

υποσχόμενο εργαλείο στη διάγνωση της πνευμονικής φυματίωσης σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Βέβαια πρέπει να γίνουν και άλλες μελέτες που θα περιλαμβάνουν μεγαλύτερο αριθμό ασθενών [329].

### 3.8.3 Εφαρμογή των IGRA στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό

Η φυματιώδης μηνιγγίτιδα παρουσιάζει θνησιμότητα περίπου 20-41% στις βιομηχανικές χώρες και 44-69% στις αναπτυσσόμενες. Η διάγνωση της αποτελεί μεγάλη πρόκληση καθώς η κλινική εικόνα είναι μη ειδική και η μικροβιολογική απόδειξη δύσκολη. Η χρώση Ziehl-Neelsen έχει χαμηλή ευαισθησία (10-20%) και η καλλιέργεια του εγκεφαλονωτιαίου υγρού έχει επίσης χαμηλή ευαισθησία και καθυστερεί χρονικά. Οι Thomas MM et al εξέτασαν αν στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με φυματιώδη μηνιγγίτιδα είναι παρόντα T-κύτταρα που εκκρίνουν ιντερφερόνη- $\gamma$  έναντι των ειδικών αντιγόνων ESAT6 και CFP10, αν μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος ELISPOT στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και αν παρουσιάζει διαγνωστική ακρίβεια στη φυματιώδη μηνιγγίτιδα. Το ELISPOT στο αίμα εμφάνισε θετικά αποτελέσματα σε 9/11 ασθενείς με φυματιώδη μηνιγγίτιδα, δηλαδή ευαισθησία 82%, ενώ στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε 9/10, δηλαδή ευαισθησία 90%. Στους controls το ELISPOT στο αίμα εμφάνισε θετικά αποτελέσματα σε 2/8, δηλαδή ειδικότητα 75%, ενώ στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό σε 0/7, δηλαδή ειδικότητα 100%. Υπήρχε καλή συμφωνία μεταξύ του ELISPOT στο αίμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό:  $\kappa = 0.94$  (95% CI 0.81-1.00). Σύμφωνα με τους συγγραφείς το ELISPOT στο αίμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό μπορεί να αποτελέσει ένα γρήγορο, υψηλής ευαισθησίας εργαλείο για τη διάγνωση της φυματιώδους μηνιγγίτιδας, παρ' όλα αυτά πρέπει να γίνουν έρευνες με μεγαλύτερο αριθμό συμμετεχόντων, οι οποίες θα περιλαμβάνουν και ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς [330].

Οι Luca MC et al υπολόγισαν το όφελος των μεθόδων IGRA στη διάγνωση της φυματιώδους μηνιγγίτιδας εξετάζοντας 50 ασθενείς και εφαρμόζοντας στο αίμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό τη μέθοδο QuantiFERON TB Gold. Η ευαισθησία της μεθόδου στο αίμα ήταν 78.57% και η ειδικότητα 88.4%, ενώ η ειδικότητα της μεθόδου στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ήταν υψηλότερη 96.1%. Η θετική προγνωστική αξία της εξέτασης ήταν >90%. Το τελικό συμπέρασμα των συγγραφέων ήταν ότι η μέθοδος QuantiFERON TB Gold στο αίμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ήταν πιο γρήγορη και ευαίσθητη για τη διάγνωση της φυματιώδους μηνιγγίτιδας από ότι το άμεσο παρασκεύασμα του εγκεφαλονωτιαίου υγρού και της καλλιέργειας του αίματος [331].



Τέλος, οι Uchibori et al σε μελέτη περίπτωσης ασθενούς παρατήρησαν σε 53χρονη ασθενή με κεφαλαλγία και μηνιγγικά σημεία με όλες τις εξετάσεις ρουτίνας αρνητικές, εκτός από αυξημένη ADA στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ότι η μέθοδος IGRA στο αίμα και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ήταν θετικές. Η ασθενής θεραπεύτηκε με τη χρήση αντιφυματικής θεραπείας. Οι συγγραφείς βάσει των παραπάνω θεωρούν ότι οι μέθοδοι IGRA στο αίμα σε συνδυασμό με το εγκεφαλονωτιαίο υγρό μπορεί να αποτελέσουν χρήσιμα διαγνωστικά εργαλεία στην ενεργό φυματίωση του κεντρικού νευρικού συστήματος [332].

#### 3.8.4 Εφαρμογή των IGRA στο περικαρδιακό υγρό

Η φυματίωση αποτελεί αιτία περικαρδίτιδας σε ποσοστό 5% στην Ευρώπη και στη Βόρεια Αμερική και σε ποσοστό >60% στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η κλινική της εικόνα είναι μη ειδική και από τις εργαστηριακές εξετάσεις η ADA του περικαρδιακού υγρού έχει ευαισθησία 90% και ειδικότητα περίπου 74%, ενώ η καλλιέργεια και η PCR που αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο για τη διάγνωση παρουσιάζουν ευαισθησία <55%. Η βιοψία περικαρδίου μπορεί μόνο να ενισχύσει τη θνησιμότητα. Λόγω των παραπάνω οι Biglino et al αποφάσισαν να εξετάσουν τη διαγνωστική αξία του T-SPOT.TB σε μια 57χρονη ασθενή ύποπτη για φυματιώδη περικαρδίτιδα, η οποία προσήλθε με εικόνα επιποματισμού. Η μέθοδος T-SPOT.TB εφαρμόστηκε και είχε θετικά αποτελέσματα τόσο στο αίμα όσο και στο περικαρδιακό υγρό με έντονη απάντηση τόσο στο ESAT6 όσο και στο CFP10. Ο αριθμός των ειδικών T-λεμφοκυττάρων ήταν ελαφρώς μεγαλύτερος στο περικαρδιακό υγρό από ότι στο αίμα. Αν και δεν υπήρξε μικροβιολογική επιβεβαίωση της φυματιώδους αιτιολογίας της περικαρδίτιδας η ασθενής αντέδρασε άμεσα και παρατεινόμενα στην αντιφυματική θεραπεία παραμένοντας 14 μήνες μετά το τέλος της ελεύθερης νόσου με βάση τα παραπάνω δεδομένα οι συγγραφείς θεωρούν την T-SPOT.TB ως υποβοηθητική μέθοδο για την έναρξη αντιφυματικής θεραπείας και ότι πρέπει να γίνουν περισσότερες μελέτες για το ρόλο της τόσο σε χαμηλού όσο και σε υψηλού επιπολασμού, για φυματίωση, περιοχές [333].

#### 3.8.5 Εφαρμογή των IGRA στο περιτοναϊκό υγρό

Η φυματίωση του εντέρου είναι σπάνια στις Δυτικές χώρες με επίπτωση 35.7 και 0.43 ανά 100.000 πληθυσμό ανά χρόνο για τους μετανάστες και τους ντόπιους αντίστοιχα. Η διάγνωση της είναι δύσκολη καθώς μιμείται φλεγμονώδεις νόσους εντέρου και

κακοήθεις νεοπλασίες και η μικροβιολογική επιβεβαίωση είναι χρονοβόρα. Οι Caputo D et al μελέτησαν τη χρησιμότητα του QuantiFERON TB Gold σε δυο περιστατικά. Στο πρώτο περιστατικό μόνο το χειρουργικό βιοψτικό υλικό ήταν ασθενώς θετικό με τη μέθοδο Ziehl-Neelsen ενώ το QuantiFERON TB Gold ήταν θετικό και ο ασθενής αντιμετωπίστηκε με αντιφυματική θεραπεία. Στο δεύτερο περιστατικό η διάγνωση ετέθη πάλι με την ίδια μέθοδο καθώς οι άλλες μικροβιολογικές εξετάσεις ήταν αρνητικές για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Στο δεύτερο ασθενή εφαρμόστηκε το QuantiFERON TB Gold και στο αίμα και στο περιτοναϊκό υγρό και ήταν θετικό και στις δυο περιπτώσεις. Οι συγγραφείς θεωρούν ότι η χρήση του QuantiFERON TB Gold μπορεί να είναι ελπιδοφόρα για τη διάγνωση σε ύποπτων για φυματίωση νόσων του εντέρου αλλά εκτεταμένη έρευνα είναι απαραίτητη [334].

Οι Kim S et al μελέτησαν, μαζί με τις ισχύουσες διαγνωστικές μεθόδους, τη χρησιμότητα του T-SPOT.TB στη διάγνωση της φυματίωσης σε 48 ασθενείς ύποπτους για φυματίωση του γαστρεντερικού συστήματος. Από τους 48 ασθενείς οι 30 (63%) αποδείχτηκε ότι είχαν φυματίωση και οι 18 (38%) όχι. Η μέθοδος T-SPOT.TB εφαρμόστηκε στο αίμα και στους 48 ασθενείς και στο περιτοναϊκό υγρό στους 11. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου στο αίμα ήταν 89% και 78% αντίστοιχα ενώ τα ενδιάμεσα αποτελέσματα ήταν 6%, στο περιτοναϊκό υγρό ήταν 83% και 100% αντίστοιχα ενώ δεν υπήρχαν ενδιάμεσα αποτελέσματα. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα οι συγγραφείς θεωρούν ότι η μέθοδος T-SPOT.TB μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο βοήθημα στις υπάρχουσες τεχνικές για τη διάγνωση της φυματίωσης του γαστρεντερικού συστήματος [335].

### **3.9 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των IGRA σε σχέση με την TST**

Πρόσφατες έρευνες αποδεικνύουν ότι οι μέθοδοι IGRA έχουν υψηλότερη ειδικότητα από ότι η TST, παρόμοια ευαισθησία, καλύτερη συσχέτιση με δείκτες που σχετίζονται με την έκθεση στο μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης σε περιοχές με χαμηλό επιπολασμό της νόσου. Άλλα πλεονεκτήματα είναι ότι δεν εμφανίζουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω προηγούμενου εμβολιασμού με BCG, γεγονός χρήσιμο σε πληθυσμούς με υψηλούς δείκτες εμβολιασμού, ενώ επηρεάζονται λιγότερο από τη λοίμωξη με άτυπα μυκοβακτηρίδια, αν εξαιρέσουμε τα *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. leprae*. Εκτός από τα παραπάνω είναι απαραίτητος μικρότερος αριθμός επισκέψεων για την ολοκλήρωση της

εξέτασης, αποφεύγονται οι υποκειμενικές και αναξιόπιστες μετρήσεις όπως είναι πιθανόν να συμβεί κατά τη μέτρηση της δερματικής σκληρίας. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα για επαναλαμβανόμενες εξετάσεις χωρίς να προκαλείται το “φαινόμενο ενίσχυσης (boosting effect)”, μειώνονται οι πιθανότητες εμφάνισης αλλεργικών αντιδράσεων ή αναφυλαξίας καθώς δεν εγγέονται αντίγονα στον οργανισμό. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι μέθοδοι IGRA επηρεάζονται σε μικρότερο βαθμό από την ανεργία, γεγονός που χρειάζεται εκτεταμένη έρευνα για να αποδειχθεί, καθώς και ότι μπορούν να προσδιορίσουν με μεγαλύτερη ακρίβεια από ότι η TST τα άτομα στα οποία η λανθάνουσα φυματίωση μπορεί να εξελιχθεί σε ενεργή νόσο [249, 283].

Παρ’ όλα αυτά οι μέθοδοι IGRA εμφανίζουν και ορισμένα μειονεκτήματα. Οι αιμοληψίες μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να είναι ανεπιθύμητες ή ανεπιτυχείς, όπως είναι δυνατόν να συμβεί στην περίπτωση των παιδιών, τα δείγματα πρέπει να μεταφερθούν και να υποστούν επεξεργασία στο εργαστήριο μέσα σε 8-12 ώρες, γεγονός που δεν είναι πρακτικό για απομακρυσμένες περιοχές. Μπορεί να υπάρξουν λάθη κατά την τοποθέτηση των δειγμάτων στα φιαλίδια ή κατά τη μεταφορά τους. Τα αρχικά έξοδα για τον εξοπλισμό είναι υψηλότερα από αυτά που αντιστοιχούν στην TST, ενώ είναι απαραίτητη και η ύπαρξη εξειδικευμένου προσωπικού. Ορισμένα ακόμα μειονεκτήματα είναι η μη ικανότητα διάκρισης της λανθάνουσας από την ενεργό φυματίωση, τα πιθανά ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε λοίμωξη από τα *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. leprae* και η πιθανότητα εμφάνισης ενδιάμεσων αποτελεσμάτων είτε λόγω της μειωμένης απάντησης στο μιτογόνο ή στην υψηλή απάντηση στο control (φυσιολογικό ορό) [336].

### 3.10 Ανακεφαλαίωση

- ❖ Οι μέθοδοι IGRA είναι εξετάσεις αίματος που υποβοηθούν στη διάγνωση της λανθάνουσας και ενεργού φυματίωσης. Βασίζονται στην ανίχνευση παραγωγής ιντερφερόνης-γ από ενεργοποιημένα T κύτταρα μνήμης μετά από έκθεση σε ειδικά για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης αντιγόνα τα οποία είναι απόντα από το BCG και τα περισσότερα άτυπα μυκοβακτηρίδια.
- ❖ Τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται είναι τα ESAT6, CFP10, TB7.7
- ❖ Εμπορικές διαθέσιμες μέθοδοι IGRA είναι τα QuantiFERON TB Gold και QuantiFERON TB Gold in tube που βασίζονται στη μέτρηση της ιντερφερόνης-γ με

τη μέθοδο ELISA και το T-SPOT. TB που βασίζεται στη μέτρηση της ιντερφερόνης- $\gamma$  με τη μέθοδο ELISPOT.

- ❖ Οι μέθοδοι IGRA έχουν σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της TST: απαιτούν μια επίσκεψη για την ολοκλήρωση της εξέτασης, αποφυγή υποκειμενικών μετρήσεων, την ικανότητα για διαδοχικές εξετάσεις (serial testing) χωρίς την ανάπτυξη του φαινομένου ενίσχυσης, υψηλότερη ειδικότητα, αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω εμβολιασμού με BCG και λοίμωξης από άτυπα μυκοβακτηρίδια, πιθανώς μικρότερη επίδραση από την ανεργία, αποφυγή αλλεργίας ή αναφυλακτικών αντιδράσεων.
- ❖ Τα αποτελέσματα των IGRA χαρακτηρίζονται ως θετικά, αρνητικά και ενδιάμεσα. Τα ενδιάμεσα αποτελέσματα είναι πιο συνηθισμένα σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Ένα εμμέμον ενδιάμεσο αποτέλεσμα λόγω φτωχής απάντησης στο μιτογόνο υποδεικνύει την ανεργία του ασθενούς.
- ❖ Οι μέθοδοι IGRA παρουσιάζουν παρόμοια ευαισθησία με την TST για τη διάγνωση ενεργού φυματίωσης και αποτελούν σημαντικές βοηθητικές εξετάσεις σε περιοχές χαμηλού επιπολασμού.
- ❖ Το T-SPOT. TB πιθανόν είναι πιο ευαίσθητη αλλά λιγότερο ειδική από το QuantiFERON TB Gold
- ❖ Οι μέθοδοι IGRA δεν έχουν τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ λανθάνουσας και ενεργού φυματίωσης
- ❖ Υπάρχουν ενδείξεις ότι η εφαρμογή των μεθόδων IGRA στα BAL, πλευριτικό υγρό, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, περιτοναϊκό υγρό και περικαρδιακό υγρό αποτελούν σημαντικές υποβοηθητικές εξετάσεις για τη διάγνωση πνευμονικής και εξωπνευμονικής φυματίωσης.

## **Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **Α΄ ΦΑΣΗ**

### **1. ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι η σύγκριση της δερμοαντίδρασης Mantoux και των τεχνικών «απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ» και συγκεκριμένα της μεθόδου QuantiFERON TB Gold in tube σε νεοσύλλεκτους άρρηνες του Ελληνικού Στρατού, που είχαν εμβολιαστεί με BCG στην παιδική τους ηλικία και οι οποίοι δεν είχαν στο παρελθόν έκθεση σε φυματίωση. Επίσης μελετάται η επίδραση στην τιμή της TST του χρονικού διαστήματος που παρήλθε από τον εμβολιασμό με BCG.

Λαμβάνοντας υπόψη τις κοινωνικές και οικονομικές συνέπειες καθώς και τις παρενέργειες που προκύπτουν από την εφαρμογή της θεραπείας της λανθάνουσας φυματίωσης είναι πιθανόν τα αποτελέσματα της μελέτης μας να βοηθήσουν στην εφαρμογή κατάλληλης στρατηγικής για τη θεραπεία της λανθάνουσας φυματίωσης που θα οδηγούσε στην αποφυγή της ψυχολογικής φθοράς, των οικονομικών απωλειών και της τοξικότητας μιας άσκοπης θεραπείας.

## 2. ΥΛΙΚΟ- ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μελέτη διενεργήθη σε κέντρα κατάταξης νεοσύλλεκτων στρατιωτών στην περιοχή της βορειοδυτικής Ελλάδας και συγκεκριμένα στους νομούς Ιωαννίνων και Άρτας από τον Νοέμβριο του 2007 μέχρι τον Νοέμβριο του 2008. Στη μελέτη έλαβαν μέρος 1765 νεοσύλλεκτοι στρατιώτες σε σύνολο 56368 καταταχθέντων σε διάφορα κέντρα κατάταξης σε όλη την Ελλάδα. Όλοι οι συμμετέχοντες ήταν γεννημένοι και ζούσαν στην Ελλάδα και ήταν όλοι εμβολιασμένοι με BCG στην παιδική τους ηλικία. Η κατάσταση εμβολιασμού τους πιστοποιήθηκε με την παρουσία ουλής που παραμένει μετά τον εμβολιασμό με BCG ή από αναγραφή του εμβολίου στο ατομικό βιβλιário υγείας τους. Άτομα, τα οποία ελάμβαναν κατά τη διάρκεια της μελέτης θεραπεία για ενεργό ή λανθάνουσα φυματίωση, άτομα με ισχυρή υποψία ενεργής νόσου, σοβαρές παρενέργειες κατά τη διενέργεια φυματινοαντίδρασης στο παρελθόν ή στο παρόν, γνωστή έκθεση σε φυματίωση ή οποιαδήποτε γνωστή κατάσταση ανοσοκαταστολής αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Οι συμμετέχοντες μπορεί να θεωρηθούν αντιπροσωπευτικό δείγμα για όλη τη χώρα καθότι προέρχονταν από διάφορα μέρη της Ελλάδας και ανήκαν σε διαφορετικά κοινωνικό-οικονομικά και μορφωτικά στρώματα. Ο υπό μελέτη πληθυσμός υποβλήθηκε σε κλινική εξέταση και ακτινογραφία θώρακα. Δεν πραγματοποιήθηκε εξέταση για HIV λοίμωξη, καθώς δεν κρίθηκε απαραίτητο λόγω του χαμηλού επιπολασμού της νόσου στη χώρα μας. Ο ελάχιστος χρόνος από προηγούμενη εφαρμογή δερμοαντίδρασης Mantoux ήταν 6 μήνες ώστε να αποφευχθεί η ανάπτυξη φαινομένου υπερευαισθησίας. Σε κάθε έναν συμμετέχοντα χορηγήθηκε ένα ερωτηματολόγιο, το οποίο περιελάμβανε τις εξής παραμέτρους: δημογραφικά στοιχεία, ιατρικό ιστορικό, ιστορικό προηγηθείσας ενεργού ή λανθάνουσας φυματίωσης με την ανάλογη θεραπεία, κατάσταση του εμβολιασμού με BCG, χρονολογία και αιτιολογία προηγηθείσας δερμοαντίδρασης Mantoux και το αποτέλεσμα της, ιστορικό επαφής με ασθενείς με φυματίωση καθώς και πρόσφατη επίσκεψη σε χώρα με υψηλό επιπολασμό σε φυματίωση. Βασιζόμενοι στις απαντήσεις του ερωτηματολογίου αποκλείσαμε 15 νεοσύλλεκτους, οι οποίοι έπασχαν από χρόνια νοσήματα, είχαν λάβει θεραπεία για ενεργό ή λανθάνουσα φυματίωση ή ανέφεραν πρόσφατη επαφή με άτομα που νοσούσαν με φυματίωση. 1750 νεοσύλλεκτοι ήταν ο τελικός αριθμός εγγεγραμμένων στη μελέτη. Το QuantiFERON TB Gold in tube εκτελέστηκε σε όλους τους εμβολιασμένους με TST > 0mm και σε 18 άτομα με TST=0mm, οι οποίοι αποτέλεσαν και την αρνητική ομάδα ελέγχου. Η μελέτη βασίστηκε

στις οδηγίες του National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) της Μεγάλης Βρετανίας και του Canadian Tuberculosis Committee of the Public Health Agency of Canada του Καναδά όσον αφορά στην ανίχνευση των ατόμων με λανθάνουσα φυματίωση. Οι οδηγίες συνιστούν μια διαδικασία δυο βημάτων με πραγματοποίηση, αρχικά, της δερμοαντίδρασης Mantoux σε όλους τους συμμετέχοντες και στη συνέχεια εφαρμογή του QuantiFERON TB Gold in tube στα άτομα με θετική TST.

Η δερμοαντίδραση Mantoux πραγματοποιήθηκε με χορήγηση 0.1 ml (2 TU) κεκαθαρμένης φυματίνης (PPD, RT23, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) στην εσωτερική επιφάνεια του αριστερού βραχίονα κάθε εξεταζόμενου. Τα αποτελέσματα της φυματινοαντίδρασης Mantoux αναγνώστηκαν 72 ώρες μετά την εφαρμογή της και η μέγιστη εγκάρσια διάμετρος της σκληρίας υπολογίστηκε με τη «μέθοδο του στυλό» (ballpoint pen-ruler method). Στη συνέχεια τα αποτελέσματα ταξινομήθηκαν σε 4 κατηγορίες: κατηγορία 0: 0 mm, κατηγορία 1: 1-4 mm, κατηγορία 2: 5-9 mm, κατηγορία 3: 10-14 mm και κατηγορία 4:  $\geq 15$ mm.

Την ημέρα της ανάγνωσης της TST εφαρμόστηκε η «δοκιμασία απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$ » και συγκεκριμένα το QuantiFERON –TB Gold in tube. Για κάθε ασθενή συλλέγεται μετά από φλεβοκέντηση 1 ml αίματος για κάθε ένα από τα τρία ηπαρινισμένα QuantiFERON –TB Gold in tube φιαλίδια συλλογής αίματος. Το πρώτο φιαλίδιο είναι επικαλυμμένο με τα αντιγόνα ESAT6, CFP10 και το TB7.7. Το δεύτερο φιαλίδιο αποτελεί τον αρνητικό ρυθμιστή (negative control) και το τρίτο φιαλίδιο περιέχει το μιτογόνο (mitogen control), και είναι επικαλυμμένο με φυτοαιμαγλουτινίνη. Στη συνέχεια τα φιαλίδια ανακινήθηκαν και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 16-24 ώρες. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και το πλάσμα αποθηκεύτηκε στους 4 °C μέχρι την εφαρμογή της ELISA. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν θετικά εφόσον το επίπεδο της ιντερφερόνης- $\gamma$  του αρνητικού ρυθμιστή ήταν λιγότερο από 8.0 IU/ml, η τιμή της ιντερφερόνης- $\gamma$  σε απάντηση στα αντιγόνα μείον τη συγκέντρωση σε απάντηση στον αρνητικό control είναι  $\geq 0.35$  IU/ml και  $\geq 25\%$  της τιμής του αρνητικού control. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν αρνητικά είτε εφόσον η τιμή της ιντερφερόνης- $\gamma$  σε απάντηση στα αντιγόνα μείον τη συγκέντρωση σε απάντηση στον αρνητικό control είναι  $\geq 0.35$  IU/ml αλλά  $\leq 25\%$  της τιμής του αρνητικού control, είτε  $\leq 0.35$  IU/ml. Ενδιάμεσα αποτελέσματα καθορίστηκαν είτε ως συγκέντρωση της ιντερφερόνης- $\gamma$  του αρνητικού ρυθμιστή  $\geq 8.0$  IU/ml, είτε ως συγκέντρωση της ιντερφερόνης- $\gamma$  του μιτογόνου  $\leq 0.5$  IU/ml με τιμή της ιντερφερόνης- $\gamma$



σε απάντηση στα αντιγόνα μείον τη συγκέντρωση σε απάντηση στον αρνητικό control είτε λιγότερο από 0.35 IU/ml ή λιγότερο από το 25% της τιμής του αρνητικού ρυθμιστή.

Οι παράμετροι που μετρήθηκαν ή υπολογίσθηκαν εκφράστηκαν ως μέσες τιμές με σταθερά απόκλιση. Οι διαφορές μεταξύ των υποομάδων εκτιμήθηκαν στατιστικά με βάση το student's t-test για μέσες τιμές. Για τον προσδιορισμό της συμφωνίας μεταξύ TST και QFT-GIT χρησιμοποιήθηκε η στατιστική μέθοδος kappa ( $\kappa$ ) statistics. Όριο στατιστικής σημαντικότητας για τις αναλύσεις καθορίστηκε η τιμή  $p < 0.05$ .

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη έλαβαν μέρος 1765 νεοσύλλεκτοι στρατιώτες σε σύνολο 56368 καταταχθέντων σε όλη την Ελλάδα. Από αυτούς αποκλείστηκαν 15 νεοσύλλεκτοι γιατί είχαν λάβει θεραπεία για ενεργό ή λανθάνουσα φυματίωση στο παρελθόν, έπασχαν από χρόνια νοσήματα ή είχαν έρθει πρόσφατα σε επαφή με άτομα που έπασχαν από φυματίωση. Ο τελικός αριθμός των συμμετεχόντων στη μελέτη ήταν 1750 άτομα.

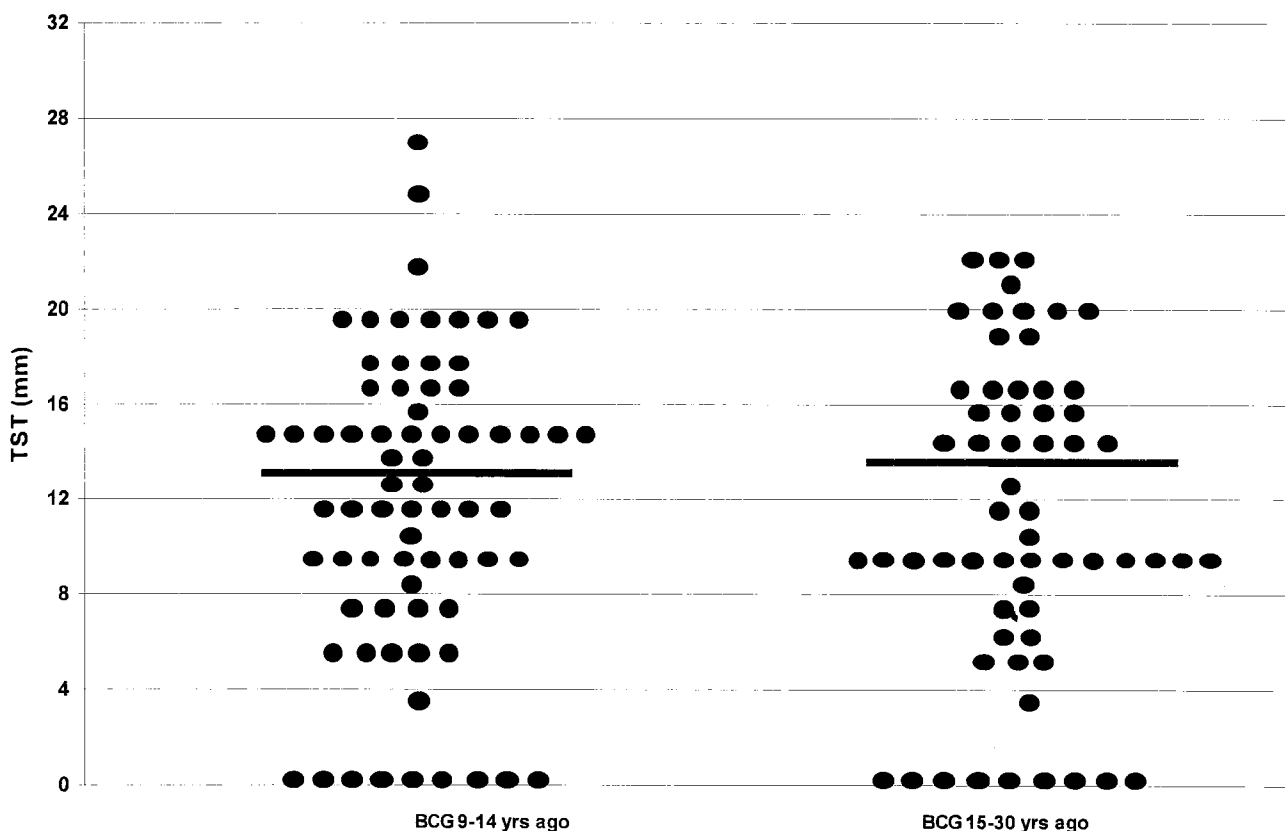
Στον πίνακα 3.1 συνοψίζονται όλα τα βασικά χαρακτηριστικά του υπό μελέτη πληθυσμού. Ο μέσος όρος ηλικίας των συμμετεχόντων ήταν  $24.3 \pm 4$  έτη με διακύμανση από 18-39 έτη. Από το σύνολο των 1750 ατόμων τα 96 (5.4%) εμφάνιζαν θετική TST με διάμετρο σκληρίας  $\geq 10$  mm. Οι 111 συμμετέχοντες, οι οποίοι εμφάνιζαν δερμοαντίδραση Mantoux μεγαλύτερη από 0 mm διαχωρίστηκαν, ανάλογα με το μέγεθος της σκληρίας, σε 4 κατηγορίες. Η κατηγορία 1 περιελάμβανε άτομα με TST 1-4 mm, η κατηγορία 2 άτομα με TST 5-9 mm, η κατηγορία 3 άτομα με 10-14 mm και η κατηγορία 4 άτομα με TST  $\geq 15$  mm. Από τους συμμετέχοντες 1 άτομο (0.9%) άνηκε στην κατηγορία 1, 14 άτομα (12.6%) στην κατηγορία 2, 37 (33.3%) στην κατηγορία 3 και 59 νεοσύλλεκτοι (53.2%) άνηκαν στην κατηγορία 4. 1639 (93.7%) νεοσύλλεκτοι εμφάνισαν TST 0mm. Για λόγους λειτουργικότητας έγινε τυχαία επιλογή 18 εξ αυτών, ώστε να αποτελέσουν την αρνητική ομάδα ελέγχου της μελέτης.

**Πίνακας 3.1. Βασικά χαρακτηριστικά του υπό μελέτη πληθυσμού**

<b>Παράμετροι</b>	<b>Αποτελέσματα(N)</b>	<b>%</b>
<b>Γένος</b>		
Άρρενες	1750	100
Θήλειες	0	0
<b>Ηλικία (έτη)</b>		
18-25	1355	77.4
26-30	275	15.7
31-39	120	6.9
Μέσος όρος ηλικίας $\pm$ διακύμανση	24.3 $\pm$ 4	
<b>Εμβολιασμός με BCG</b>		
Ναι	1750	100
<b>TST <math>\geq</math>10 mm</b>		
Θετική	96	5.4
Αρνητική	1654	94.6
Μέση θετική τιμή TST $\pm$ διακύμανση(mm)	14.3 $\pm$ 5.1	
<b>Αποτελέσματα TST</b>		
0mm	1639/1750	93.7
1-4mm	1/111	0.9
5-9mm	14/111	12.6
10-14mm	37/111	33.3
$\geq$ 15mm	59/111	53.2
<b>Αποτελέσματα QFT-GIT</b>		
Θετικά	13/129	10
Αρνητικά	116/129	90

Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση στην τιμή της TST του χρονικού διαστήματος που παρήλθε από τον εμβολιασμό με BCG. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα αποτελέσματα της δερμοαντίδρασης Mantoux ανάμεσα στα άτομα που είχαν εμβολιαστεί 9-14 χρόνια πριν την εφαρμογή της TST και στα άτομα που είχαν εμβολιαστεί 15-29 χρόνια πριν ( $13.66 \pm 5.43$  mm vs  $14.07 \pm 5.65$  mm,  $p=0.43$ ). Η παραπάνω συσχέτιση φαίνεται στο Διάγραμμα 3.1.

**Διάγραμμα 3.1.** Διάγραμμα υπό τη μορφή dot plot (στικτών απεικονίσεων) που παρουσιάζει την αντίδραση TST των συμμετεχόντων που εμβολιάστηκαν με BCG πριν από 9-14 και 15-29 έτη αντίστοιχα.



\* Η κόκκινη γραμμή καταδεικνύει τη μέση τιμή της TST: 13.66 mm για τα άτομα που εμβολιάστηκαν πριν από 9-14 χρόνια και 14.07 mm για τους εμβολιασμένους πριν από 15-30 χρόνια.

Οι παραπάνω παρατηρήσεις δεν μεταβλήθηκαν ακόμα και όταν αποκλείστηκαν τα άτομα που εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα με την τεχνική QuantiFERON TB Gold in tube ( $13.3 \pm 4.88\text{mm}$  vs  $13.98 \pm 5.73 \text{ mm}$   $p=0.25$ ). Στη συνέχεια έγινε περαιτέρω ανάλυση των παραπάνω δεδομένων με χρήση της στατιστικής τεχνικής Spearman rank correlation test προκειμένου να αναπτυχθεί το χρονικό διάστημα ως μια συνεχής μεταβλητή. Και με αυτή τη μέθοδο δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην τιμή της TST και στο χρονικό διάστημα από τον εμβολιασμό με BCG (Spearman's coefficient,  $\rho= 0.033$ ,  $P\text{-value} = 0.736$ ).

Θετικά αποτελέσματα με τη μέθοδο QuantiFERON TB Gold in tube διαπιστώθηκαν σε 11 από τους 96 συμμετέχοντες που εμφάνιζαν θετική Mantoux (11.4%). Δεν παρατηρήθηκαν ενδιάμεσα αποτελέσματα. Η μέση τιμή της ιντερφερόνης- $\gamma$  στα άτομα με θετικό αποτέλεσμα ήταν  $0.93 \pm 3.6\text{IU/ml}$  (με διακύμανση από 0.38-25.36 IU/ml). Η πλειονότητα των ατόμων, που εμφάνισαν αρνητικά αποτελέσματα είχαν τιμή ιντερφερόνης- $\gamma$  ακριβώς ή περίπου 0 IU/ml. Ένας μόνο από τους συμμετέχοντες εμφάνισε τιμή ιντερφερόνης- $\gamma$  λίγο πιο κάτω από το όριο (0.34IU/ml).

Όταν η ομαδοποίηση έγινε με βάση την τιμή της TST παρατηρήθηκαν τα εξής: Από τους νεοσύλλεκτους με τιμή TST: 1-9 mm 1 στους 14 παρουσίαζαν θετικό αποτέλεσμα QFT-GIT, με τιμή TST:10-14 mm κανένας από τους 36 δεν παρουσίαζε θετικό αποτέλεσμα και ανάμεσα σε αυτούς με TST  $\geq 15\text{mm}$  θετικοί ήταν οι 11 από τους 57. Από τα άτομα που αποτελούσαν την αρνητική ομάδα ελέγχου (TST: 0 mm) 1 στους 18 εμφάνισε θετικό αποτέλεσμα με τη μέθοδο QuantiFERON TB Gold in tube. Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 3. 2.

**Πίνακας 3.2 Συνολική συμφωνία ανάμεσα στα αποτελέσματα της TST και της QFT-GIT**

Αποτελέσματα QFT-GIT (αριθμός ατόμων)	Αριθμός (%) ατόμων με αποτελέσματα QFT για τιμή TST διαμέτρου				
	0 mm	1-4 mm	5-9 mm	10-14 mm	$\geq 15 \text{ mm}$
Αρνητικά (116)	17(13.2)	1(0.7)	13(10)	37(28.6)	48(37.2)
Θετικά (13)	1(0.7)	0(0)	1(0.7)	0(0)	11(8.5)
Συνολικά (129)	18(14)	1(0.7)	14(10.8)	37(28.6)	59(45.7)

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τις πρόσφατες έρευνες και αναφορές επιπολασμού υπολογίζεται ότι περίπου το 1/3 του παγκόσμιου πληθυσμού έχει μολυνθεί από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης [1]. Ο μεγάλος αριθμός ατόμων με λανθάνουσα φυματίωση αποτελεί μεγάλο εμπόδιο στην εξάλειψη της φυματίωσης. Η θεραπεία των ατόμων με λανθάνουσα φυματίωση μπορεί να μειώσει αποτελεσματικά την πρόοδο της λανθάνουσας λοίμωξης σε ενεργό νόσο [2].

Μέχρι πρόσφατα, όμως, δεν είχαν αναπτυχθεί ακριβείς τεχνικές που θα μπορούσαν να ανιχνεύσουν τα άτομα με λανθάνουσα φυματίωση που εμφανίζουν τον μεγαλύτερο για ανάπτυξη ενεργού νόσου.

Για περισσότερο από έναν αιώνα και μέχρι πρόσφατα η ενδοδερμική φυματινοαντίδραση Mantoux αποτελούσε τη μοναδική μέθοδο αξιολόγησης της μόλυνσης από μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης [3]. Αν και έχει αποδειχτεί χρήσιμη στην κλινική πράξη εμφανίζει ορισμένα σημαντικά μειονεκτήματα. Τα σπουδαιότερο από αυτά είναι η εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων εξαιτίας λοίμωξης με άτυπα μυκοβακτηρίδια ή μετά από εμβολιασμό με BCG, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την εφαρμογή περιττής θεραπείας [4].

Για την αντιμετώπιση των παραπάνω μειονεκτημάτων, τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν νέες *in vitro* τεχνικές οι οποίες υπολογίζουν την ιντερφερόνη- $\gamma$  που απελευθερώνεται από διεγερμένα, μετά από επαφή με ειδικά για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης αντιγόνα, T λεμφοκύτταρα. Οι τεχνικές αυτές ονομάζονται « δοκιμασίες απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$ » ή *interferon- $\gamma$  release assays (IGRAs)*. Τα τελευταία χρόνια δυο είδη μεθόδων IGRA είναι εμπορικά διαθέσιμα. Το πρώτο ονομάζεται *QuantiFERON –TB Gold assay* και διατίθεται σε δυο τύπους: α) στον τύπο 24-well culture plate format (την πλάκα με τα 24 φρεάτια), ο οποίος έχει εγκριθεί από τον Αμερικάνικο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (US Food and Drug Administration) και χρησιμοποιείται στην Αμερική και β) έναν πιο σύγχρονο και απλό τύπο το *QuantiFERON –TB Gold in tube assay*, ο οποίος διαθέτει φιαλίδια συλλογής αίματος τα οποία είναι ήδη επικαλυμμένα με τα αντιγόνα. Ο δεύτερος τύπος χρησιμοποιείται σε χώρες εκτός Αμερικής. Τα *QuantiFERON –TB Gold assay* μετράνε τη συγκέντρωση της παραγόμενης ιντερφερόνης- $\gamma$  με τη μέθοδο ανοσοπροσφορητικής ανάλυσης στερεάς φάσης (ELISA). Η δεύτερη τεχνική IGRA που είναι εμπορικά διαθέσιμη είναι το T-SPOT. TB. Διατίθεται σε

δυο μορφές: α) στον τύπο με την πλάκα των 96 φρεατίων (96-well plate) ή T-SPOT.TB 96 και β) στον τύπο με τις ταινίες 8 φρεατίων (8-well strips) ή T-SPOT.TB 8. Το T-SPOT.TB assay απαριθμεί τα T- κύτταρα που παράγουν ιντερφερόνη-γ χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ELISPOT [1].

Ο εμβολιασμός με BCG χρησιμοποιείται σε πολλές χώρες για περισσότερο από 80 χρόνια ως ένα σημαντικό όπλο κατά της φυματίωσης, παρά τη μη καλά καθορισμένη προστατευτική αξία του και την επίδραση του στην ανάγνωση της φυματινοαντίδρασης Mantoux. Αποτελεί το πιο ευρέως χορηγούμενο εμβόλιο καθώς χρησιμοποιείται στο 80% των νεογνών και των βρεφών στις χώρες στις οποίες περιλαμβάνεται στο εθνικό πρόγραμμα εμβολιασμού [5]. Στην Ελλάδα ο εμβολιασμός με BCG είναι υποχρεωτικός με νομοθεσία του 1960 και μέχρι το 1988 γινόταν σε ηλικία 12 ετών. Από το 1988 ο εμβολιασμός πραγματοποιείται όταν το παιδί γίνει 6 ετών ή αμέσως μετά τη γέννηση του σε περίπτωση διαβίωσης σε περιβάλλον με αυξημένο κίνδυνο [6].

Στον ελληνικό στρατό οι νεοσύλλεκτοι στρατιώτες παρουσιάζονται στα κέντρα κατάταξης σε ηλικία 18-35 ετών και υποβάλλονται άμεσα σε ιατρικές εξετάσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν και την εφαρμογή Mantoux. Τα άτομα που εμφανίζουν TST  $\geq$  10mm θεωρούνται υποψήφια για θεραπεία λανθάνουσας φυματίωσης, ενώ τα άτομα με TST  $\geq$  15mm υποχρεούνται να λάβουν θεραπεία ανεξαρτήτως προηγηθέντος ή όχι εμβολιασμού με BCG.

Σε χώρες του εξωτερικού έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες που ερευνούσαν τη χρησιμότητα των τεχνικών απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ στη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης σε στρατιωτικές εγκαταστάσεις [7,8]. Επίσης, έχει πραγματοποιηθεί μελέτη, που συνέκρινε την αποτελεσματικότητα των τεχνικών Mantoux και Quantiferon TB Gold in tube για τη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης σε μη εμβολιασμένο με BCG στρατιωτικό προσωπικό [9]. Τέλος έχουν διενεργηθεί μελέτες που συνέκριναν τις τεχνικές Mantoux και IGRA σε ομάδες ατόμων που έχουν εμβολιαστεί με BCG [10-13].

Στην Ελλάδα έχει πραγματοποιηθεί μόνο μια μελέτη η οποία ερευνά το βαθμό συμφωνίας των τεχνικών QuantiFERON TB Gold in tube και Mantoux σε τυχαίο πληθυσμό [14]. Η επίπτωση των πρόσφατα αναφερόμενων κρουσμάτων φυματίωσης στην Ελλάδα είναι 7 άτομα ανά 100000 πληθυσμού, τιμή που έχει υποεκτιμηθεί όπως φαίνεται σε προηγούμενη μελέτη [15]. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας

υπολογίζονται περίπου 19 νέα κρούσματα φυματίωσης ανά 100000 πληθυσμό ανά έτος στην Ελλάδα, ποσοστό από τα υψηλότερα στη δυτική Ευρώπη [16].

Λόγω του προαναφερθέντος υψηλού ποσοστού νέων κρουσμάτων φυματίωσης στην Ελλάδα και λόγω του γεγονότος ότι οι νεοσύλλεκτοι στρατιώτες, εξαιτίας των συνθηκών διαβίωσης, αποτελούν μια εν δυνάμει μεγάλη «δεξαμενή» ανάπτυξης ενεργού νόσου αποφασίστηκε η διενέργεια, για πρώτη φορά στην Ελλάδα, μελέτης που συνέκρινε την αποτελεσματικότητα των τεχνικών «απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ», συγκεκριμένα της μεθόδου QuantiFERON TB Gold in tube, και της δερμοαντίδρασης Mantoux σε νεοσύλλεκτους άρρηνες του Ελληνικού Στρατού, οι οποίοι έχουν εμβολιαστεί με BCG στην παιδική τους ηλικία και οι οποίοι δεν είχαν ποτέ έκθεση σε φυματίωση.

Η μελέτη μας κατέδειξε σημαντική ασυμφωνία ανάμεσα στην TST και μία σύγχρονη εμπορική τεχνική IGRA, συγκεκριμένα το QFT-GIT, όταν χρησιμοποιήθηκαν σε 1750 νεοσύλλεκτους στρατιώτες, οι οποίοι είχαν ιστορικό εμβολιασμού με BCG στην παιδική ηλικία. Από τους νεοσύλλεκτους, που εξετάστηκαν, το 5.4% είχαν θετικά αποτελέσματα TST, με διάμετρο σκληρίας ίση ή μεγαλύτερη από 10mm. Ανάμεσα σε αυτούς που εμφάνιζαν θετική TST μόνο το 11.4% εμφάνιζαν θετικά αποτελέσματα με την τεχνική QFT-GIT και όλοι είχαν διάμετρο σκληρίας ίση ή μεγαλύτερη από 15mm.

Στη μελέτη μας δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στη διάμετρο της σκληρίας της TST ανάμεσα στην ομάδα των νεοσύλλεκτων που είχαν υποβληθεί σε εμβολιασμό με BCG πριν από 9-14 χρόνια και σε αυτή την ομάδα που είχαν υποβληθεί πριν από 15-29 χρόνια. Βάσει της προηγούμενης παρατήρησης μπορούμε να υποθέσουμε ότι η επίδραση του εμβολιασμού με BCG στην TST είναι πολύ μεγάλης διάρκειας.

Η φτωχή ειδικότητα της TST στη μελέτη μας φαίνεται να οφείλεται καθ' υπερβολή στη διαδεδομένη στην Ελλάδα πρακτική του εμβολιασμού με BCG. Τα ευρήματά μας φαίνεται να συμφωνούν με αυτά προηγούμενων μελετών, οι οποίες έχουν διενεργηθεί σε ομάδες ατόμων που είχαν εμβολιαστεί με BCG και καταδεικνύουν χαμηλή συμφωνία μεταξύ TST και IGRAs [11-13]. Σε μετα-ανάλυση των Pai M et al διαπιστώθηκε εξαιρετική ειδικότητα των IGRA, η οποία παρέμενε ανεπηρέαστη από τον εμβολιασμό με BCG. Όσον αφορά στην τεχνική της Mantoux παρατηρήθηκε υψηλή ειδικότητα σε πληθυσμιακές ομάδες που δεν είχαν εμβολιαστεί με BCG και χαμηλή και με εξαιρετική διακύμανση ειδικότητα σε πληθυσμούς εμβολιασμένους με BCG [13]. Έχει γενικά καθορισθεί ότι αντιδράσεις TST μεγαλύτερες από 10 mm αρκετά χρόνια μετά από



εμβολιασμό με BCG πρέπει να ερμηνεύονται ως αποτέλεσμα λανθάνουσας λοίμωξης με το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης αντί ως εμμένουσας επίδρασης του εμβολιασμού με BCG [4,17,18,19]. Αυτή η αντίληψη, όμως, τέθηκε πρόσφατα σε αμφισβήτηση από μια μετα-ανάλυση 36 μελετών. Η μετα-ανάλυση αυτή εκτιμά ότι η επίδραση του εμβολιασμού με BCG στην TST είναι πράγματι μηδαμινή μετά από δέκα χρόνια από τον εμβολιασμό όταν αυτός έχει πραγματοποιηθεί στη νηπιακή ηλικία (infancy). Η ίδια όμως επίδραση είναι ουσιαστική σε άτομα που έχουν εμβολιαστεί μετά τα πρώτα γενέθλια τους και αποτελεί το 21.2% των θετικών αποτελεσμάτων της TST δέκα χρόνια μετά τον εμβολιασμό με BCG [4]. Σε προηγούμενη μελέτη μας, στην οποία γινόταν εκτίμηση της επίδρασης του εμβολιασμού με BCG στην τιμή της TST είχε παρατηρηθεί σταδιακή πτώση της τιμής της TST όταν ο εμβολιασμός είχε προηγηθεί 2 – 20 χρόνια νωρίτερα. Παρ' όλα αυτά 8.6% των ατόμων που είχαν εμβολιαστεί πριν από 16 – 20 χρόνια παρουσίαζαν τιμή της TST μεγαλύτερη από 10mm [20]. Σε αυτή τη μελέτη μας κατά την εξέταση της επίδρασης του χρονικού διαστήματος από την παρέλευση του εμβολιασμού με BCG στην τιμή της TST δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα αποτελέσματα της TST ανάμεσα στα άτομα που είχαν εμβολιαστεί 9-14 χρόνια πριν την εφαρμογή της δερμοαντίδρασης Mantoux και στα άτομα που είχαν εμβολιαστεί 15-29 χρόνια πριν. Είναι αξιοπρόσεχτο το γεγονός ότι ο εμβολιασμός με BCG προκαλεί ασυμφωνία μεταξύ TST και IGRAs όχι μόνο σε πληθυσμούς χαμηλού ρίσκου για νόσηση από φυματίωση αλλά και σε προσωπικό νοσοκομείων και σε άτομα με πρόσφατη επαφή με άτομα που νοσούν από φυματίωση σε χώρες με χαμηλό ή ενδιάμεσο φορτίο φυματίωσης (low and intermediate tuberculosis burden.) [21,22].

Μια άλλη αιτία που θα μπορούσε να έχει συντελέσει στη χαμηλή ειδικότητα της TST στη μελέτη μας είναι η έκθεση σε άτυπα μυκοβακτηρίδια, όπως στο *m. avium* και στο *m. scrofulaceum* [23]. Συνήθως η έκθεση σε άτυπα μυκοβακτηρίδια προκαλεί τιμές της TST μεταξύ 5-15mm [24,25]. Αυτό παρουσιάζεται καθαρά στην εργασία των von Reyn και συνεργατών, που πραγματοποιήθηκε ανάμεσα σε 784 εργαζόμενους στον χώρο της υγείας και σε φοιτητές της Ιατρικής σχολής στην Αμερική, και η οποία καταδεικνύει ότι η έκθεση στο *mycobacterium avium* ήταν υπεύθυνη στο 82% των ατόμων που παρουσίασαν κατά τη διενέργεια της Mantoux σκληρία διαμέτρου 5-9 mm και στο 50% των ατόμων με σκληρία διαμέτρου 10-14 mm [24]. Έχει υπολογιστεί στη προηγούμενη μελέτη μας ότι η ευαισθησία στα άτυπα μυκοβακτηρίδια σε Έλληνες νεοσύλλεκτους στρατιώτες είναι 4.1%

σε αυτούς που κατάγονται από ορεινές περιοχές και 7.1% σε αυτούς που διαμένουν σε παραθαλάσσιες περιοχές [25]. Σε μελέτη, που πραγματοποιήθηκε από άλλη ερευνητική ομάδα στον Ελλαδικό χώρο, επιχειρήθηκε η ανίχνευση και η μοριακή ταυτοποίηση των άτυπων μυκοβακτηριδίων στην χρονική περίοδο από το 2005-2009. Από τα 85540 δείγματα τα 2.9% παρουσίασαν θετικό άμεσο παρασκεύασμα (acid fast). Στο 87% αυτών αναγνωρίστηκε το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης ως αιτιολογικός παράγοντας και μόνο στο 12.8% τα άτυπα μυκοβακτηρίδια [26]. Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν το μικρό ποσοστό των άτυπων μυκοβακτηριδίων στη χώρα μας ενισχύοντας την άποψη μας ότι η φτωχή ειδικότητα της δερμοαντίδρασης Mantoux στη μελέτη μας οφείλεται στην πρακτική του εμβολιασμού με BCG. Το αντιγόνο που χρησιμοποιείται στη Mantoux είναι ένα μείγμα από μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα, τα οποία είναι επίσης παρόντα στα στελέχη που χρησιμοποιούνται στον εμβολιασμό με BCG καθώς και σε άτυπα μυκοβακτηρίδια. Αντιθέτως οι τεχνικές απελευθέρωσης ιντερφερόνης  $\gamma$  βασίζονται στα, ειδικά αντιγόνα του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης, στα ESAT-6, CFP-10 και στο TB7.7(P4). Τα παραπάνω αντιγόνα είναι απόντα από τον εμβολιασμό με BCG που βασίζεται στο στέλεχος *M. bovis* αλλά και από τα περισσότερα άτυπα μυκοβακτηρίδια. Εξαίρεση αποτελούν τα *M. szulgai*, *M. marinum* και *M. kansasii*, τα οποία κωδικοποιούν το ESAT-6 και το CFP-10. Σε μια πρόσφατη μελέτη, η οποία περιελάμβανε παιδιά που νοσούσαν από φυματιώδη λεμφαδενίτιδα και από λεμφαδενίτιδα από άτυπα μυκοβακτηρίδια οι τεχνικές απελευθέρωσης ιντερφερόνης  $\gamma$  (IGRA) διέκριναν καλύτερα την λοίμωξη από φυματίωση από αυτή από άτυπα μυκοβακτηρίδια σε σύγκριση με την TST [27].

Μια άλλη πιθανή αιτία για την ασυμφωνία ανάμεσα στις IGRA και στην Mantoux είναι ότι μπορεί η ευαισθησία των IGRA να μην είναι ιδεατή προκαλώντας ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα [28]. Υπάρχουν υποθέσεις σύμφωνα με τις οποίες η TST ανιχνεύει τόσο πρόσφατες όσο και λοιμώξεις σε αποδρομή ενώ οι IGRA ανιχνεύουν μόνο πρόσφατες λοιμώξεις ή λοιμώξεις σε εξέλιξη. Ο πιθανολογούμενος μηχανισμός που εξηγεί το ότι οι IGRA ανιχνεύουν πρόσφατες λοιμώξεις ή λοιμώξεις σε εξέλιξη είναι ότι οι τεχνικές IGRA ανιχνεύουν ενεργοποιημένα effector T λεμφοκύτταρα και κύτταρα μνήμης, τα οποία πρόσφατα ήρθαν σε επαφή με το αντιγόνο και έτσι μπορούν γρήγορα να απελευθερώσουν ιντερφερόνη  $\gamma$  μετά από διέγερση τους *in vitro*, και τα οποία όμως παραμένουν στην κυκλοφορία για περιορισμένο διάστημα αφότου απομακρυνθούν τα αντιγόνα [29,30,31,32]. Εντούτοις, υπάρχουν μελέτες οι οποίες έρχονται σε αντίθεση με

την αντίληψη για μειωμένη ευαισθησία των IGRA παρέχοντας δεδομένα που καταδεικνύουν ικανοποιητική συμφωνία μεταξύ των IGRA και της TST σε μη εμβολιασμένους με BCG τόσο σε πληθυσμούς με μικρή πιθανότητα για ανάπτυξη φυματίωσης όσο και σε περιοχές με ενδημική φυματίωση (tuberculosis endemic countries) [33,34].

Τα υψηλά ποσοστά μεταστροφών στα αποτελέσματα των IGRA πρέπει να ληφθούν υπόψη ως μια πιθανή αιτία για την ασυμφωνία ανάμεσα στα αποτελέσματα της TST και του QFT-GIT στη μελέτη μας. Σε πρόσφατες μελέτες που αφορούν διαδοχικές εξετάσεις με τις τεχνικές απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$  παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά μεταστροφών ακόμη και σε πρόσφατα εκτεθειμένα άτομα [35,36]. Η μεταστροφή στις τιμές των IGRA είναι πιο πιθανή όταν τα baseline επίπεδα των επιπέδων της ιντερφερόνης  $-\gamma$  είναι ασθενώς θετικά και η τιμή της TST είναι αρνητική [37]. Αν ισχύει η παραπάνω υπόθεση, οι ασθενώς θετικές τιμές με τις τεχνικές απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$  μπορούν να μετατραπούν σε αρνητικές τιμές μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τη συχνότητα των θετικών αποτελεσμάτων καθώς άτομα θετικά με τις τεχνικές IGRA μετατρέπονται σε αρνητικά, άρα μειώνοντας έτσι την ευαισθησία της τεχνικής IGRA. Η εξέλιξη της μεταστροφής φαίνεται να είναι άμεσα εξαρτημένο από τη χρονική στιγμή που διενεργείται η τεχνική απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$  και η σπουδαιότητα και η προγνωστική της αξία πρέπει να γίνουν αντικείμενο μεγάλης κλίμακας μελετών.

Ένας σημαντικός περιορισμός της μελέτης μας ήταν ο μικρός αριθμός των ατόμων με αρνητική TST (TST < 10 mm), τα οποία υπεβλήθησαν σε εκτίμηση με τη χρήση της τεχνικής απελευθέρωσης ιντερφερόνης  $-\gamma$ . Για πρακτικούς λόγους μόνο 18 άτομα με αρνητική TST επιλέχθηκαν τυχαία και υπεβλήθησαν σε εξέταση με την τεχνική QuantiFERON TB Gold in tube. Σε αυτή τη μελέτη δεν κατέστη δυνατή η εκτίμηση της ασυμφωνίας μεταξύ αρνητικών αποτελεσμάτων με την μέθοδο Mantoux και θετικών αποτελεσμάτων με τη μέθοδο IGRA. Άλλες μελέτες έχουν βρει ασυμφωνία μεταξύ αρνητικών αποτελεσμάτων με την μέθοδο Mantoux και θετικών αποτελεσμάτων με τη μέθοδο IGRA σε διαφορετικούς πληθυσμούς σε ποσοστά που κυμαίνονται από 1-11% [3].

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν την επίδραση του εμβολιασμού με BCG στη ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μεθόδου Mantoux και αποτυπώνουν την υψηλή ειδικότητα της μεθόδου QFT-GIT, η οποία φαίνεται ότι

παραμένει ανεπηρέαστη από προηγθέντα εμβολιασμό με BCG. Επίσης, στην παρούσα μελέτη καταδεικνύεται ότι το χρονικό διάστημα που παρήλθε από τη στιγμή του εμβολιασμού δεν έχει σημαντική επίδραση στην τιμή της TST. Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα και στο γεγονός ότι ο εμβολιασμός με BCG στην Ελλάδα είναι υποχρεωτικός και πραγματοποιείται από το 1988 σε ηλικία 6 ετών προτείνουμε την προσέγγιση με δυο βήματα στην προσπάθεια προσδιορισμού των νεοσύλλεκτων στρατιωτών, που πρέπει να λάβουν θεραπεία για λανθάνουσα φυματίωση. Όλοι οι νεοσύλλεκτοι πρέπει να εξετάζονται με τη μέθοδο Mantoux και αυτοί που εμφανίζουν τιμές ίσες ή μεγαλύτερες από 10 mm πρέπει να εξετάζονται και με τη μέθοδο απελευθέρωσης ιντερφερόνης  $\gamma$ . Οι εξεταζόμενοι που παρουσιάζουν θετικά αποτελέσματα με τη μέθοδο IGRA και μόνο αυτοί, θα πρέπει να λάβουν θεραπεία για λανθάνουσα φυματίωση. Υπολογίσαμε ότι αν αυτή η προσέγγιση είχε ακολουθηθεί στον πληθυσμό της μελέτης μας μόνο 13 νεοσύλλεκτοι θα ελάμβαναν θεραπεία, σε αντίθεση με τους 96 που έλαβαν τελικά. Ανάγοντας τα αποτελέσματα της μελέτης μας στον συνολικό αριθμό νεοσύλλεκτων που παρουσιάζονται στα κέντρα κατάταξης σε όλη την Ελλάδα (56.368 νεοσύλλεκτοι) υπολογίζουμε ότι θεραπεία για λανθάνουσα φυματίωση από τον Νοέμβριο του 2007 μέχρι και τον Νοέμβριο του 2008 θα ελάμβαναν μόνο 419 νεοσύλλεκτοι βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της μεθόδου IGRA και 3092 βασιζόμενοι στη μέθοδο Mantoux. Αυτή η προσέγγιση θα απάλλαζε 2673 νεοσύλλεκτους από ανωφελή θεραπεία και πιθανές σημαντικές παρενέργειες. Η ηπατική βλάβη λόγω χρήσης φαρμακευτικών ουσιών αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα, καθώς το ήπαρ παίζει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων. Το παραπάνω πρόβλημα προκαλεί ιδιαίτερη ανησυχία κατά τη θεραπεία της ενεργού και της λανθάνουσας φυματίωσης. Ηπατική βλάβη μπορεί να προκληθεί με όλα τα προτεινόμενα για τη λανθάνουσα φυματίωση θεραπευτικά σχήματα, συμπεριλαμβανομένων της ισονιαζίδης χορηγούμενης ως μονοθεραπεία για 6 ή 9 μήνες, της ριφαμπικίνης χορηγούμενης για 4 μήνες, και του συνδυασμού ισονιαζίδης και ριφαμπικίνης για 3 μήνες [38]. Σε μελέτη των LoBue PA et al σημειώθηκαν τριπλάσιες τιμές των τρανσαμινασών σε συμπτωματικούς ασθενείς που ελάμβαναν θεραπεία για λανθάνουσα φυματίωση και πενταπλάσιες τιμές τρανσαμινασών χωρίς εμφάνιση συμπτωμάτων σε ποσοστό 0.3% [39]. Σε πρόσφατες ανασκοπήσεις το ποσοστό υπολογίζεται σε 0.1-0.56% [39-41]. Σε Καναδική μελέτη τα ποσοστά της φαρμακευτικής ηπατίτιδας ήταν παρόμοια σε ασθενείς που ελάμβαναν θεραπεία με σχήμα ισονιαζίδης και ριφαμπικίνης και σε ασθενείς που ελάμβαναν ισονιαζίδη για 12 μήνες [42]. Σε μια μετα-

ανάλυση το ποσοστό της συμπτωματικής ηπατίτιδας σε άτομα που ελάμβαναν ισονιαζίδη και ριφαμπικίνη υπολογίστηκε στο 2.55% [43]. Βασιζόμενοι στις παραπάνω μελέτες, υπολογίστηκε ότι τρίμηνο θεραπευτικό σχήμα με ισονιαζίδη και ριφαμπικίνη σε 2673 νοεσύλλεκτους με τιμή TST  $\geq 10$  mm θα μπορούσε να προκαλέσει σοβαρή ηπατοτοξικότητα σε 0.3% (περίπου δέκα άτομα) και θάνατο σε 0.08% (περίπου δυο περιπτώσεις). Με την προσέγγιση στον προσδιορισμό των ατόμων, που χρήζουν αγωγής για τη λανθάνουσα φυματίωση, με δυο βήματα θα μπορούσαν να αποφευχθούν η ψυχολογική φθορά, η οικονομική επιβάρυνση και η τοξικότητα των φαρμάκων από μια ανώφελη θεραπεία.

## **Β΄ ΦΑΣΗ**

### **1. ΣΚΟΠΟΣ**

Σκοπός της Β΄ φάσης της μελέτης είναι η αποτίμηση της πρόσθετης αξίας των πρόσφατα ανεπτυγμένων τεχνικών απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$  (interferon- $\gamma$  release assays) στην ανίχνευση της λανθάνουσας φυματίωσης σε ηλικιωμένους που διέμεναν σε γηροκομείο και ήρθαν σε άμεση επαφή με άτομο που έπασχε από ενεργό φυματίωση. Συγκεκριμένα έγινε συσχέτιση των αποτελεσμάτων της μεθόδου QuantiFERON TB Gold in tube και της μεθόδου Mantoux.

## 2. ΥΛΙΚΟ – ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε τον Νοέμβριο του 2008 και αποτέλεσε μια λεπτομερή προσπάθεια ανίχνευσης ατόμων με λανθάνουσα φυματίωση μεταξύ ηλικιωμένων που είχαν έρθει σε επαφή με άτομο που νοσούσε με ενεργό φυματίωση. Η μελέτη έλαβε χώρα σε ένα γηροκομείο στα Ιωάννινα, στη Βορειοδυτική Ελλάδα.

Στις αρχές του Οκτωβρίου του 2008 παρουσιάστηκε στην Πνευμονολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων μια εκ των διαμενόντων σε γηροκομείο των Ιωαννίνων αιτιώμενη υψηλό πυρετό (39° C), απώλεια βάρους και αδυναμία, με έναρξη των συμπτωμάτων ένα μήνα περίπου πριν την εισαγωγή της στο νοσοκομείο. Η TST που πραγματοποιήθηκε κατά την εισαγωγή της ήταν αρνητική (0 mm). Η ακτινογραφία θώρακος και η αξονική θώρακος, στα οποία υπεβλήθη, κατέδειξαν εκτεταμένα πνευμονικά διηθήματα σε αμφοτέρους τους κάτω πνευμονικούς λοβούς καθώς και δεξιά πυλαία και παρατραχειακή λεμφαδενοπάθεια. Το άμεσο παρασκεύασμα και η καλλιέργεια των πτυέλων για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης ήταν αρνητικά αλλά το άμεσο παρασκεύασμα, η καλλιέργεια και η PCR των βρογχικών εκκρίσεων που ελήφθησαν με βρογχοσκόπηση ήταν θετικά για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Η εξέταση ευαισθησίας κατέδειξε ότι το στέλεχος ήταν ευαίσθητο σε όλα τα φάρμακα και η ασθενής έλαβε αντιφυματική αγωγή με ισονιαζίδη και ριφαμπικίνη για έξι μήνες και εθαμβουτόλη και πυραζιναμίδη για δυο μήνες. Η ασθενής είχε μεταφερθεί στο συγκεκριμένο γηροκομείο τρεις μήνες πριν την εμφάνιση των συμπτωμάτων και το ιατρικό ιστορικό της περιελάμβανε υπερτασική καρδιοπάθεια, για την οποία ελάμβανε αντιυπερτασική αγωγή. Δεν είχε προηγούμενο ιστορικό ενεργού φυματίωσης, άλλης πνευμονικής νόσου ή ανοσοκαταστολής.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο κίνδυνος εμφάνισης ενεργού ή λανθάνουσας φυματίωσης είναι ακόμα μεγαλύτερος σε οίκους ευγηρίας όπου υπάρχει μεγαλύτερη εγγύτητα-συγχρωτισμός των τροφίμων [1], θεωρήθηκε αναγκαία η εξονυχιστική ανίχνευση των ατόμων που ήρθαν σε άμεση επαφή με την πάσχουσα από ενεργό φυματίωση ασθενή, για τη διαπίστωση εμφάνισης ενεργού ή λανθάνουσας φυματίωσης.

Η μελέτη περιελάμβανε τα άτομα που είχαν συνεχή επαφή με την ασθενή τρόφιμο και συγκεκριμένα όσα εκτέθηκαν περισσότερο από 40 ώρες πριν τη διάγνωση της νόσου [2]. Οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε κλινική εξέταση, ακτινογραφία θώρακα και δερματική φυματινοαντίδραση. Συνολικά έλαβαν μέρος 77 άτομα, τα οποία χωρίστηκαν

σε δυο ομάδες. Την πρώτη ομάδα (Group A) αποτελούσαν οι 63 ηλικιωμένοι ένοικοι του γηροκομείου (μέσος όρος ηλικίας  $82 \pm 10$  έτη) ενώ η δεύτερη ομάδα (Group B) συμπεριλάμβανε 14 νεαρούς εργαζόμενους (μέσος όρος ηλικίας  $41.2 \pm 9.2$  έτη), οι οποίοι απασχολούνταν ως νοσηλευτικό προσωπικό, προσωπικό κουζίνας και καθαρισμού. Κανένας από τους συμμετέχοντες και στις δυο ομάδες δεν ανέφερε επαφή με άτομο που έπασχε από ενεργό φυματίωση πριν την επαφή με την ασθενή ένοικο. Σε κάθε συμμετέχοντα χορηγήθηκε ένα ερωτηματολόγιο, το οποίο περιελάμβανε δημογραφικά στοιχεία, ιστορικό προηγηθείσας ενεργού ή λανθάνουσας φυματίωσης και της σχετιζόμενης με αυτές θεραπείας, ιστορικό υποκείμενων πνευμονικών και εξωπνευμονικών νοσημάτων, χρήση ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, ιστορικό εμβολιασμού με BCG και διάρκεια επαφής με την ασθενή ένοικο.

Όλα τα άτομα υπεβλήθησαν σε TST τον Νοέμβριο του 2008, λίγο μετά τη διάγνωση της ενεργού φυματίωσης στην ασθενή και ενώ είχαν παρέλθει περισσότεροι από 2 μήνες από την πρώτη επαφή μαζί της. Οι συμμετέχοντες που εμφάνισαν αρνητική τιμή TST ( $<5\text{mm}$ ) εκτιμήθηκαν με τη χρήση των τεχνικών απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$  (IGRA) και συγκεκριμένα της δοκιμασίας QuantiFERON TB Gold in tube βάσει των πρόσφατων οδηγιών, που αφορούν στην ανίχνευση της λανθάνουσας φυματίωσης με τη χρήση των IGRA [3,4].

Η δερμοαντίδραση Mantoux πραγματοποιήθηκε, από εκπαιδευμένο προσωπικό, με χορήγηση 0.1 ml (2 TU) κεκαθαρμένης φυματίνης (PPD, RT23, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) στην εσωτερική επιφάνεια του αριστερού βραχίονα κάθε εξεταζόμενου. Τα αποτελέσματα της TST διαβάστηκαν 72 ώρες μετά την εφαρμογή της και η μέγιστη εγκάρσια διάμετρος της σκληρίας υπολογίστηκε με τη «μέθοδο του στυλό» (ballpoint pen-ruler method). Τιμές της TST ίσες ή μεγαλύτερες από 5mm θεωρήθηκαν θετικές βάσει των οδηγιών της American Thoracic Society [5]. Βάσει των τιμών της TST οι ομάδες A και B του εξεταζόμενου πληθυσμού ταξινομήθηκαν σε δυο υποομάδες. Η υποομάδα 1 συμπεριλάμβανε τα άτομα με θετική τιμή TST και η υποομάδα 2 τα άτομα με αρνητική τιμή TST. Για την τεχνική απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$  από κάθε συμμετέχοντα στη μελέτη συλλέχθηκε, μετά από φλεβοκέντηση, 1 ml αίματος για κάθε ένα από τα τρία ηπαρινισμένα QuantiFERON –TB Gold in tube φιαλίδια συλλογής αίματος. Το πρώτο φιαλίδιο ήταν επικαλυμμένο με τα αντιγόνα ESAT6, CFP10 και το TB7.7. Το δεύτερο φιαλίδιο αποτελεί τον αρνητικό ρυθμιστή (negative control) και το τρίτο φιαλίδιο περιέχει το μιτογόνο (mitogen control), και είναι επικαλυμμένο με



φυτοαιμαγλουτινίνη. Μέσα σε 8 ώρες από τη λήψη των δειγμάτων τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37°C για 16-24 ώρες. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και το πλάσμα αποθηκεύτηκε στους 4 °C μέχρι την εφαρμογή της ELISA βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή. Για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων της ιντερφερόνης-  $\gamma$  στο πλάσμα χρησιμοποιήθηκε η ανοσοπροσοφορική μέθοδος QuantiFERON TB Gold in tube. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν θετικά εφόσον η τιμή της ιντερφερόνης-  $\gamma$  σε απάντηση στα αντιγόνα μείον τη συγκέντρωση σε απάντηση στον αρνητικό control είναι  $\geq 0.35$  IU/ml και  $\geq 25\%$  της τιμής του αρνητικού control. Η τεχνική θεωρείται αξιόπιστη και σαφής, όταν η συγκέντρωση της ιντερφερόνης- $\gamma$  του μιτογόνου μείον της συγκέντρωσης της ιντερφερόνης- $\gamma$  του αρνητικού ρυθμιστή  $\geq 0.5$  IU/ml, ή τιμή της ιντερφερόνης-  $\gamma$  σε απάντηση στα αντιγόνα μείον τη συγκέντρωση σε απάντηση στον αρνητικό control είναι  $\geq 0.35$  IU/ml [6]. Η εκτέλεση της τεχνικής IGRA έγινε την ημέρα ανάγνωσης της TST δηλαδή 72 ώρες μετά την πραγματοποίηση της TST. Αυτό έγινε για να αποφευχθούν τυχόν ενισχυμένες (boosting effect) IGRA απαντήσεις λόγω της προηγηθείσας TST, καθώς πρόσφατη μελέτη καταδεικνύει ότι η παρεμβολή τουλάχιστον τριών ημερών μεταξύ της εφαρμογής της δερμοαντίδρασης Mantoux και των τεχνικών απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$  αποτελεί ένα ασφαλές χρονικό διάστημα [7].

Το προσωπικό του εργαστηρίου που πραγματοποιούσε το QuantiFERON TB Gold in tube δεν είχε πρόσβαση σε κλινικές πληροφορίες των εξεταζόμενων ώστε να αποφευχθεί η προκατάληψη.

Οι παράμετροι που μετρήθηκαν ή υπολογίσθηκαν στη μελέτη μας εκφράστηκαν ως μέσες τιμές με σταθερά απόκλιση. Διαφορές μεταξύ των υποομάδων εκτιμήθηκαν με τη χρήση του Student -  $t$  test για μέσες τιμές. Όριο στατιστικής σημαντικότητας για τις αναλύσεις καθορίστηκε η τιμή  $p < 0.05$ .

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον πίνακα 1 συνοψίζονται τα βασικά χαρακτηριστικά όλων των συμμετεχόντων. 20 (31.7%) ηλικιωμένοι ένοικοι του οίκου ευγηρίας (Ομάδα Α), εμφάνιζαν θετική δερμοαντίδραση Mantoux ( $\geq 5$ mm). Από τους εργαζόμενους στο γηροκομείο (Ομάδα Β) 6 άτομα (43%) εμφάνιζαν θετική Mantoux. Η μέση τιμή της TST ήταν  $5.5 \pm 9.3$  mm για τους ηλικιωμένους και  $5.8 \pm 7.9$  mm για τους εργαζόμενους. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην τιμή της TST στα άτομα με θετικά αποτελέσματα ανάμεσα στις δυο ομάδες. Οι δυο ομάδες στη συνέχεια υποδιαιρέθηκαν σε δυο υποομάδες. Στην υποομάδα 1 περιλαμβάνονταν τα άτομα που εμφάνιζαν θετική τιμή δερμοαντίδρασης Mantoux και στη υποομάδα 2 συμπεριλαμβάνονταν τα άτομα με αρνητική τιμή Mantoux. Συνολικά 26 άτομα εμφάνιζαν θετική φυματινοαντίδραση, από αυτά τα 20 ανήκαν στην ομάδα των ηλικιωμένων και τα 6 στην ομάδα των νεαρών εργαζόμενων. Όλοι υπεβλήθησαν σε θεραπεία για λανθάνουσα φυματίωση, μετά από εξονυχιστική διερεύνηση προκειμένου να αποκλεισθεί η ενεργός νόσος.

**Πίνακας 1. Βασικά χαρακτηριστικά του υπό μελέτη πληθυσμού**

Παράμετροι	Ομάδα Α(ηλικιωμένοι) (%)	Ομάδα Β (νεαροί)(%)
Άρρενες	11/63(17.5)	1/14(7.1)
Μέσος όρος ηλικίας ±διακύμανση	82±10	41.2±9.2
TST 0 mm	43/63(68.3)	8/14(57.1)
1-4mm	0/63(0)	0/14(0)
$\geq 5$ mm	20/63(31.7)	6/14(42.9)
Μέση τιμή TST±διακύμανση (mm)	5.5±9.3	5.8±7.9

Τα 51 άτομα του υπό μελέτη πληθυσμού που εμφάνισαν αρνητική τιμή της δερμοαντίδρασης Mantoux εκτιμήθηκαν περαιτέρω με τη χρήση της τεχνικής QuantiFERON TB Gold in tube. Από τα παραπάνω 51 άτομα, τα 43 ανήκαν στους ηλικιωμένους ενοίκους και τα 8 στους εργαζόμενους στο γηροκομείο. Δεν υπήρχαν ενδιάμεσα αποτελέσματα με την τεχνική IGRA. Κανένας από τους εξεταζόμενους δεν ανέφερε λοίμωξη από HIV (human immunodeficiency virus), θεραπεία με κορτικοστεροειδή ή άλλα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, κακοήθεια, σακχαρώδη διαβήτη ή πρόσφατο εμβολιασμό με ζώντες ιούς στο ιατρικό ιστορικό του. Κανένα από τα άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη δεν υποβαλόταν σε αιμοκάθαρση.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, θετικά αποτελέσματα με την τεχνική απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$  σημειώθηκαν σε 7 άτομα με αρνητική τιμή TST αυξάνοντας το ποσοστό των ατόμων με πιθανή λανθάνουσα φυματίωση από 31.7%, όπως είχε υπολογιστεί μόνο με τη χρήση της φυματινοαντίδρασης Mantoux σε 42.9% όταν ελήφθησαν υπόψη τα θετικά αποτελέσματα της Mantoux ή του QuantiFERON TB Gold in tube.

**Πίνακας 2. Αποτελέσματα του QuantiFERON TB Gold in tube στον υπό μελέτη πληθυσμό με αρνητική τιμή TST.**

Παράμετροι	Ηλικιωμένοι N (%)	Νεαροί N (%)
Άρρενες	8/43(18.6)	1/8(12.5)
Μέσος όρος ηλικίας $\pm$ διακύμανση	82 $\pm$ 11	38.8 $\pm$ 10.1
Αποτελέσματα QFT-GIT		
Θετικά	7/43(16.3)	0/8(0)
Αρνητικά	36/43(83.7)	8/8(100)
Ανοσοκατασταλτική θεραπεία	0/43(0)	0/8(0)
Υποκείμενες νόσοι		
Αναπνευστικού συστήματος	5/43(11.6)	0/8(0)
Μη-αναπνευστικού συστήματος	38/43(88.4)	0/8(0)
Συνολική διάρκεια επαφής (h)	720	240

Από τους ενοίκους του γηροκομείου που εμφάνιζαν θετικά αποτελέσματα με τη μέθοδο QuantiFERON TB Gold in tube το 14% (1/7) ήταν ηλικίας κάτω των 80 ετών, ενώ το 86% (6/7) ήταν άτομα ηλικίας άνω των 80 ετών. Αρνητικά αποτελέσματα με τη μέθοδο IGRA παρατηρήθηκαν σε 6 (14%) ενοίκους με αρνητική τιμή TST και ινωτικές βλάβες στην ακτινογραφία θώρακος.

Η μέση τιμή των επιπέδων ιντερφερόνης- $\gamma$  στα άτομα με θετικά αποτελέσματα της τεχνικής απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$  ήταν  $1.47 \pm 1.04$  IU/ml (διακύμανση 0.42-3.22 IU/ml). Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 3.

**Πίνακας 3. Επίπεδα ιντερφερόνης-  $\gamma$  σε ηλικιωμένα άτομα, με επαφή με την ασθενή, που εμφανίζουν θετικό QuantiFERON TB Gold in tube**

Ηλικία	Φύλο	IFN- $\gamma$ (IU/ml)
79	θήλυο	1.02
84	άρρεν	0.61
96	άρρεν	1.10
96	θήλυο	2.59
88	θήλυο	0.42
84	θήλυο	1.33
88	άρρεν	3.22

Από τους εξεταζόμενους ηλικιωμένους ενοίκους που εμφάνιζαν αρνητική δερμοαντίδραση Mantoux οι 37 (86%) είχαν φυσιολογικές ακτινογραφίες θώρακα, ενώ οι 6 (14%) εμφάνιζαν ινωτικές βλάβες στα κορυφαία τμήματα των πνευμόνων στην ακτινογραφία θώρακος. Κανένας από τα μέλη του προσωπικού δεν εμφάνιζε παθολογική ακτινογραφία θώρακα. Τα ακτινολογικά ευρήματα του υπό μελέτη πληθυσμού καταδεικνύονται στον πίνακα 4.

**Πίνακας 4. Ακτινολογικά ευρήματα του υπό μελέτη πληθυσμού**

Πληθυσμός	n	
	Φυσιολογικά ευρήματα	Ινωτικές βλάβες
<b>Ένοικοι</b>		
TST θετική	20	0
TST αρνητική/ QFT-GIT θετικό	7	0
TSTαρνητική/QFT-GIT αρνητικό	30	6
<b>Εργαζόμενοι</b>		
TST θετική	6	0
TST αρνητική/ QFT-GIT θετικό	0	0
TSTαρνητική/QFT-GIT αρνητικό	8	0

Δεδομένα για εμβολιασμό με BCG δεν ελήφθησαν σε παραπάνω από το 90% του εξεταζόμενου πληθυσμού. Περισσότεροι από το 90% των ηλικιωμένων τροφίμων του γηροκομείου εμφάνιζαν άνοια καθιστώντας αδύνατη τη λήψη απαντήσεων όσον αφορά την κατάσταση του εμβολιασμού. Από τους εργαζόμενους κανένας δεν έδωσε επαρκείς πληροφορίες για τυχόν εμβολιασμό με BCG στο παρελθόν γι' αυτό το λόγο, αυτή η παράμετρος δεν αναλύθηκε στη μελέτη μας.

Σε όλους τους συμμετέχοντες που εμφάνιζαν θετικά αποτελέσματα είτε με τη δερμοαντίδραση Mantoux είτε με την τεχνική απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$  (QuantiFERON TB Gold in tube) χορηγήθηκε σχήμα με ισονιαζίδη – ριφαμπικίνη για 3 μήνες σύμφωνα με τις πρόσφατες Βρετανικές οδηγίες για την αντιμετώπιση της φυματίωσης [8].

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη μελέτη αυτή έγινε προσπάθεια προσδιορισμού της πρόσθετης αξίας του QuantiFERON TB Gold in tube στην ανίχνευση της λανθάνουσας φυματίωσης σε ένα γηροκομείο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα θετικές τιμές της χρησιμοποιούμενης τεχνικής απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ παρατηρήθηκαν σε ένα σημαντικό αριθμό ηλικιωμένων με αρνητική τιμή TST κυρίως σε άτομα ηλικίας άνω των 80 ετών.

Η διάγνωση και η θεραπεία της φυματίωσης στους ηλικιωμένους αποτελεί μεγάλη πρόκληση για τους κλινικούς γιατρούς. Αυτή η πληθυσμιακή ομάδα, που μολύνθηκε από φυματίωση στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα αποτελεί τη μεγαλύτερη «δεξαμενή» λανθάνουσας φυματίωσης και βρίσκεται σε μεγάλο κίνδυνο για επανενεργοποίηση της νόσου, καθώς ένας μεγάλος αριθμός εξ αυτών αφού επιβίωσαν από την αρχική λοίμωξη συνεχίζουν να «φιλοξενούν» ζώντες βακίλους σε τυροειδοποιημένες ή σε ινωτικές βλάβες σε λανθάνουσα κατάσταση [1,9,10,11]. Υποκείμενα οξέα ή χρόνια νοσήματα, η κακή διατροφή και οι βιολογικές αλλαγές που συμβαίνουν με την ηλικία παίζουν ρόλο στην βλάβη των μηχανισμών κάθαρσης των μικροοργανισμών και στην αναμενόμενη, λόγω ηλικίας, εξασθένηση της κυτταρικής ανοσίας ευνοώντας την πιθανή επανενεργοποίηση της νόσου [10].

Σε μελέτη του Gisselbrecht παρατηρήθηκε ότι ο γηριατρικός πληθυσμός που κατοικεί σε ιδρύματα παρουσιάζει τέσσερις φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσει λανθάνουσα ή ενεργό φυματίωση σε σχέση με ηλικιωμένους ενήλικες που κατοικούν στην κοινότητα [12].

Ελάχιστες είναι οι μελέτες, που έχουν ερευνήσει την επίπτωση της επαφής με νοσούντες από ενεργό φυματίωση, σε ιδρύματα που παρέχουν φροντίδα και ενδιαίτημα σε ηλικιωμένους [13,14].

Οι διεθνείς οδηγίες όσον αφορά στην πολιτική και στις πρακτικές που πρέπει να ακολουθούνται στη διερεύνηση των ηλικιωμένων ενοίκων αλλά και των εργαζόμενων των γηροκομείων για τη φυματίωση δεν είναι σαφείς. Οι ανακοινώσεις και οι οδηγίες του Αμερικάνικου Κέντρου για την πρόληψη και αποφυγή λοιμώξεων (U.S. Centers for Disease Control and Prevention –CDC) και της Βρετανικής Θωρακικής Εταιρείας (British Thoracic Society) διαφέρουν ως προς τα ποια διαγνωστικά εργαλεία είναι πιο αποτελεσματικά για τον έλεγχο των ηλικιωμένων. Συγκεκριμένα το CDC προτείνει να ελέγχονται όλοι οι ένοικοι ιδρυμάτων για πιθανή εμφάνιση ενεργού ή λανθάνουσας

φυματίωσης με τη μέθοδο της φυματινοαντίδρασης Mantoux αμέσως μετά την είσοδό τους στο ίδρυμα [15], ενώ η BTS προτείνει τον έλεγχο για φυματίωση σε γηροκομεία στη Βρετανία με τη χρήση ακτινογραφίας θώρακος αλλά όχι απαραίτητα αμέσως μετά την είσοδο στο ίδρυμα [16]. Στην Αυστραλία δεν υπάρχουν ομόφωνες συστάσεις καθώς κάθε πολιτεία εφαρμόζει τη δική της πολιτική [14]. Στην Ελλάδα δεν υπάρχουν σαφείς θέσεις ομοφωνίας αναφορικά με την εξέταση για πιθανή παρουσία ενεργού και λανθάνουσας φυματίωσης των υποψήφιων ενοίκων ή των υπαλλήλων των γηροκομείων κατά την είσοδο τους στο ίδρυμα ή την έναρξη εργασίας αντίστοιχα. Μέχρι τώρα δεν έχει πραγματοποιηθεί μελέτη στην οποία να έχουν χρησιμοποιηθεί οι τεχνικές απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ σαν εργαλείο για την ανίχνευση πασχόντων από λανθάνουσα ή ενεργό φυματίωση σε οίκους ευγηρίας.

Στην παρούσα εργασία ένας μεγάλος αριθμός ηλικιωμένων άνω των 80 ετών, συγκεκριμένα 6/7 (86%) με αρνητική δερμοαντίδραση Mantoux παρουσίασαν θετικά αποτελέσματα με τη μέθοδο QuantiFERON TB Gold in tube. Αυτό το εύρημα καταδεικνύει ότι οι τεχνικές απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ παρουσιάζουν την ικανότητα ανίχνευσης νόσου σε άτομα που εμφανίζουν ανεργία με τη μέθοδο της TST. Σε αρκετές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε άτομα με έκπτωση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος παρατηρήθηκε ότι η ανεργία επηρεάζει λιγότερο τις τεχνικές απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ από ότι τη δερμοαντίδραση Mantoux [17,18]. Η θετικότητα της TST μειώνεται με την ηλικία [1,19]. Συγκεκριμένα μια μελέτη κατέδειξε ότι άτομα που εμφάνιζαν θετικές TST παρουσίαζαν μεταστροφή και αρνητικοποίηση τους σε ποσοστό 5% ανά έτος [20]. Αυτή η μείωση στην αντίδραση στη φυματίνη έχει αποδοθεί είτε σε καταστολή της κυτταρικής ανοσίας λόγω ηλικίας είτε στην εξουδετέρωση του «εν υπνώσει» μολυσματικού μικροοργανισμού από τον ξενιστή ή σε συνδυασμό των παραπάνω [21]. Τα θετικά αποτελέσματα με τη μέθοδο QuantiFERON TB Gold in tube υποδηλώνουν είτε πρόσφατη λοίμωξη με το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης είτε λοίμωξη που συνέβη στο παρελθόν. Πολλοί από τους συμμετέχοντες στη μελέτη που εμφάνισαν θετικά αποτελέσματα με τη μέθοδο QuantiFERON TB Gold in tube αλλά αρνητικά αποτελέσματα με τη μέθοδο της φυματινοαντίδρασης είναι πιθανόν να μολύνθηκαν στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα, τότε που η νόσος ήταν πιο διαδεδομένη. Παρ' όλα αυτά ένα μεγάλο ποσοστό ατόμων με θετικό QuantiFERON TB Gold in tube είναι άτομα που εκτέθηκαν πρόσφατα στο μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης καθώς το άτομο με το οποίο ήρθαν σε επαφή είχε άμεσο παρασκεύασμα για B-Koch, PCR και καλλιέργεια βρογχικών εκκρίσεων

θετικά. Στη σύγχρονη βιβλιογραφία υπάρχουν μοριακές επιδημιολογικές μελέτες που καταδεικνύουν ότι και άτομα που έχουν αρνητικό άμεσο παρασκεύασμα για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης μπορούν να μεταδώσουν τη νόσο σε ποσοστό περίπου 20% της αναλογίας των ατόμων με θετικό άμεσο παρασκεύασμα [22].

Στην παρούσα μελέτη με την άμεση εφαρμογή του QuantiFERON TB Gold in tube ανευρέθησαν επτά άτομα, τα οποία είχαν αρνητικές Mantoux και θετικά αποτελέσματα QuantiFERON TB Gold in tube αυξάνοντας το ποσοστό της λανθάνουσας φυματίωσης από 31.7% σε 42.9%. Σε αυτά τα επτά άτομα δεν θα είχε γίνει η διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης αν δεν είχαν χρησιμοποιηθεί οι τεχνικές IGRA ή η διάγνωση θα είχε καθυστερήσει εν αναμονή των αποτελεσμάτων της δεύτερης φυματινοαντίδρασης Mantoux με τη διαδικασία των δυο βημάτων. Επανειλημμένες TST μπορεί να διεγείρουν απαντήσεις και βασίζονται στην υποκειμενική ανάγνωση από έμπειρο προσωπικό. Οι τεχνικές απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$  έχουν το πλεονέκτημα ότι στηρίζονται στη συλλογή αίματος μια φορά χωρίς να χρειάζονται επαναλαμβανόμενες επισκέψεις και είναι μια αντικειμενική εξέταση. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι οι IGRA έχουν μεγαλύτερη ικανότητα ανίχνευσης πρόσφατης αντί παλαιάς λοίμωξης [23].

Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα στη παρούσα μελέτη είναι ότι ανευρέθησαν αρνητικά αποτελέσματα με την τεχνική QuantiFERON TB Gold σε ηλικιωμένα άτομα με αρνητική Mantoux και ευρήματα συμβατά με ιωτικές βλάβες στην ακτινογραφία θώρακα. Σύμφωνα με τις οδηγίες της ATS, που αφορούν στα άτομα που βρίσκονται σε κίνδυνο για ανάπτυξη φυματίωσης, οι παραπάνω ηλικιωμένοι θα ελάμβαναν αγωγή για λανθάνουσα φυματίωση [5]. Οι ηλικιωμένοι συμμετέχοντες στη μελέτη, οι οποίοι λόγω ηλικίας ήταν επιρρεπείς στην εμφάνιση παρενεργειών από τη λήψη αντιφυματικής αγωγής, δεν έλαβαν τελικά θεραπεία για λανθάνουσα φυματίωση λόγω των αρνητικών αποτελεσμάτων του QuantiFERON TB Gold. Λόγω του ότι υπάρχει η πιθανότητα ανάπτυξης ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων με τις τεχνικές απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$ , έγινε σύσταση για συστηματική παρακολούθηση και επανάληψη των Mantoux και IGRA.

Στην παρούσα μελέτη υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί. Δεν υπήρχαν τιμές της δερμοαντίδρασης Mantoux που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βάση, κατά τη μελέτη των ατόμων που ήρθαν σε επαφή με την ασθενή. Κρίθηκε ότι ήταν πολύ αργά να πραγματοποιηθούν Mantoux, οι τιμές των οποίων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βάση, αμέσως μετά τη γνωστοποίηση της ασθένειας της ενοίκου του γηροκομείου. Ανασκόπηση των ιατρικών αρχείων του υπό μελέτη πληθυσμού κατέδειξε ότι ένας πολύ



μικρός αριθμός ατόμων είχε υποβληθεί σε φυματινοαντίδραση Mantoux πριν την εισαγωγή τους στο γηροκομείο, αλλά και σε αυτές τις περιπτώσεις οι τιμές της TST ήταν ανακριβείς. Για αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν ταυτόχρονα TST και QuantiFERON TB Gold in tube, οκτώ έως δώδεκα εβδομάδες μετά το τέλος της επαφής με την ασθενή, βασιζόμενοι και στα πλεονεκτήματα της μεθόδου IGRA [23]. Αυτή η πρακτική οδήγησε στην έγκαιρη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης με αποτέλεσμα την αποφυγή της αγωνίας και του στιγματισμού που συνεπάγεται στην Ελλάδα η διάγνωση της φυματίωσης.

Η πιθανότητα η εφαρμογή της φυματινοαντίδρασης Mantoux σε δυο διαφορετικά χρονικά διαστήματα, να παρουσίαζε την ίδια ή ακόμα και μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση των ατόμων με λανθάνουσα φυματίωση δεν μπορεί να αποκλεισθεί (ένας μεγάλος αριθμός ατόμων με αρχικά αρνητικά αποτελέσματα της TST να εμφάνιζαν στην δεύτερη εφαρμογή της φυματινοαντίδρασης Mantoux θετικά αποτελέσματα). Ο σκοπός όμως της παρούσας μελέτης ήταν να συγκρίνει την πρόσθετη διαγνωστική αξία των τεχνικών IGRA σε σχέση με την εφαρμογή της TST μια φορά. Παρ' όλα αυτά ένας περιορισμός της μελέτης είναι ότι δεν πραγματοποιήθηκε η τεχνική της δερμοαντίδρασης Mantoux σε δυο βήματα στα άτομα με αρχικά αρνητική TST και θετική IGRA, γεγονός που θα αποκάλυπτε την αναμφίβολη διαγνωστική αξία των τεχνικών απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$  σε σύγκριση με τη μέθοδο Mantoux. Μια πρόσφατη έρευνα κατέδειξε ότι το QuantiFERON TB Gold in tube φαίνεται να αποτελεί ακριβέστερο δείκτη λανθάνουσας φυματίωσης από ότι η Mantoux και παρουσιάζει τουλάχιστον την ίδια ευαισθησία με αυτή όσον αφορά στην ανίχνευση των ατόμων που θα εμφανίσουν ενεργό φυματίωση στο μέλλον [24]. Σε μια άλλη σύγχρονη μελέτη παρατηρήθηκε ότι δεν θα είχε ανιχνευτεί λανθάνουσα φυματίωση σε εξεταζόμενους που εμφάνισαν θετικά αποτελέσματα IGRA αν είχε πραγματοποιηθεί μόνο η Mantoux ως αρχική εξέταση ελέγχου. Αυτό θα είχε συμβεί ακόμα και αν είχαν χρησιμοποιηθεί ως κατώτερο όριο, για να θεωρηθεί θετική, τα 5 mm [25]. Επιπρόσθετα έχει παρατηρηθεί ότι η συνδυασμένη χρήση IGRA και TST, θεωρώντας κατώτερο όριο θετικού αποτελέσματος της δεύτερης τα 5 mm, κατά τον έλεγχο των ατόμων που ήρθαν σε στενή επαφή με άτομο που εμφανίζει ενεργό φυματίωση, παρουσιάζει ικανοποιητική σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι με αυτή την πρακτική υπάρχει η δυνατότητα περιορισμού χορήγησης θεραπείας για λανθάνουσα φυματίωση μόνο στα άτομα που έχουν πραγματικά μολυνθεί [26].

Σκοπός της μελέτης ήταν να εκτιμηθεί η επιπρόσθετη αξία των τεχνικών απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ σε σχέση με την τεχνική της Mantoux για τη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης σε ηλικιωμένους ενοίκους ενός γηροκομείου. Με τη χρήση της μεθόδου QuantiFERON TB Gold in tube αυξήθηκε το ποσοστό διάγνωσης της λανθάνουσας φυματίωσης από 31.7% σε 42.9% καταδεικνύοντας την πρόσθετη αξία της. Η έγκαιρη διάγνωση, με τη βοήθεια και των τεχνικών απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ, και η ανάπτυξη πολιτικής πρόληψης και παρακολούθησης μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση της επίπτωσης της φυματίωσης στα ιδρύματα.

Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας συνιστάται η ταυτόχρονη χρήση των τεχνικών απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ και της μεθόδου Mantoux, στον έλεγχο των ατόμων που έχουν έρθει σε επαφή με άτομο που νοσεί από ενεργό φυματίωση, ως αξιόπιστη, βολική και ταχύτερη εναλλακτική πρακτική αντί της εφαρμογής της Mantoux σε δυο βήματα.

## 5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η φυματίωση παραμένει μία από τις πιο θανατηφόρες νόσους παγκοσμίως, μεταξύ των λοιμωδών νοσημάτων. Υπολογίζεται ότι περίπου το 1/3 της ανθρωπότητας έχει μολυνθεί από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης.

Σύμφωνα, με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας υπολογίζονται περίπου 19 νέα κρούσματα φυματίωσης ανά 100.000 πληθυσμό ανά έτος στην Ελλάδα, ποσοστό από τα υψηλότερα στη Δυτική Ευρώπη, ενώ τα περισσότερα κρούσματα παρατηρούνται σε ηλικίες άνω των 65 ετών. Επίσης, στην ηλικιακή ομάδα 25-44 ετών σημειώνεται αυξημένος αριθμός κρουσμάτων. Ένα σημαντικό βήμα για την εξάλειψη της φυματίωσης αποτελεί η έγκαιρη διάγνωση των ατόμων με λανθάνουσα φυματίωση.

Για περισσότερο από εκατό χρόνια και μέχρι πρόσφατα η φυματινοαντίδραση Mantoux αποτελούσε τη μοναδική μέθοδο αξιολόγησης της μόλυνσης από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Η τεχνική αυτή εμφανίζει ορισμένα μειονεκτήματα, το σπουδαιότερο από τα οποία είναι η εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων εξαιτίας λοίμωξης από άτυπα μυκοβακτηρίδια ή μετά από εμβολιασμό με BCG, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την εφαρμογή περιττής θεραπείας σε άτομα που εκδηλώνουν θετική αντίδραση.

Για να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω μειονεκτήματα, τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν νέες τεχνικές, οι οποίες ονομάζονται «τεχνικές απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ» (interferon-γ release assays- IGRA). Με τις παραπάνω μεθόδους υπολογίζεται η ιντερφερόνη-γ, που παράγεται από διεγερμένα, μετά από επαφή με ειδικά για το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης αντιγόνα, T- λεμφοκύτταρα. Τα εμπορικά διαθέσιμα είδη τεχνικών IGRA είναι τα QuantiFERON –TB Gold assay και T-SPOT. TB.

Η έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία της φυματίωσης στους ηλικιωμένους, οι οποίοι, λόγω μειωμένης κυτταρικής ανοσίας και υποκειμένων νοσημάτων βρίσκεται σε μεγάλο κίνδυνο για επανενεργοποίηση της νόσου αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τους κλινικούς ιατρούς.

Στην Ελλάδα ένα μεγάλο ποσοστό του γηριατρικού πληθυσμού κατοικεί σε οίκους ευγηρίας. Η επίπτωση της επαφής με νοσούντες από ενεργό φυματίωση σε τέτοια ιδρύματα έχει μελετηθεί ελάχιστα ενώ δεν υπάρχουν σαφείς και ενιαίες διεθνείς οδηγίες όσον αφορά στις πρακτικές που πρέπει να ακολουθούνται στη διερεύνηση των ηλικιωμένων ενοίκων και των εργαζόμενων στα γηροκομεία για τη φυματίωση.

Στη χώρα μας δεν έχει πραγματοποιηθεί σύγκριση της αποτελεσματικότητας των τεχνικών «απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$ » (IGRA) και της δερμοαντίδρασης Mantoux σε άτομα που έχουν εμβολιαστεί με BCG, ούτε εκτίμηση της αξίας των IGRA στη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης σε ηλικιωμένους.

Σκοπός της πρώτης φάσης της παρούσας μελέτης είναι η σύγκριση της φυματινοαντίδρασης Mantoux και των τεχνικών «απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$ » και συγκεκριμένα της μεθόδου QuantiFERON TB Gold in tube σε νεοσύλλεκτους άρρηνες του Ελληνικού Στρατού, χωρίς έκθεση σε φυματίωση στο παρελθόν, οι οποίοι είχαν εμβολιαστεί με BCG στην παιδική τους ηλικία. Επίσης μελετάται η επίδραση στην τιμή της TST του χρονικού διαστήματος που παρήλθε από τον εμβολιασμό με BCG.

Στη μελέτη έλαβαν μέρος 1765 νεοσύλλεκτοι στρατιώτες σε σύνολο 56368 καταταχθέντων σε όλη την Ελλάδα. Από αυτούς αποκλείστηκαν 15 νεοσύλλεκτοι γιατί είχαν λάβει θεραπεία για ενεργό ή λανθάνουσα φυματίωση στο παρελθόν, έπασχαν από χρόνια νοσήματα ή είχαν έρθει πρόσφατα σε επαφή με άτομα που έπασχαν από φυματίωση. Ο τελικός αριθμός των συμμετεχόντων στη μελέτη ήταν 1750 άτομα.

Από το σύνολο των 1750 ατόμων τα 96 (5.4%) εμφάνιζαν θετική TST με διάμετρο σκληρίας  $\geq 10$  mm. Οι 111 συμμετέχοντες, οι οποίοι εμφάνιζαν δερμοαντίδραση Mantoux μεγαλύτερη από 0 mm διαχωρίστηκαν, ανάλογα με το μέγεθος της σκληρίας, σε 4 κατηγορίες. Η κατηγορία 1 περιελάμβανε άτομα με TST 1-4 mm, η κατηγορία 2 άτομα με TST 5-9 mm, η κατηγορία 3 άτομα με 10-14 mm και η κατηγορία 4 άτομα με TST  $\geq 15$  mm. Από τους συμμετέχοντες 1 άτομο (0.9%) άνηκε στην κατηγορία 1, 14 άτομα (12.6%) στην κατηγορία 2, 37 (33.3%) στην κατηγορία 3 και 59 νεοσύλλεκτοι (53.2%) άνηκαν στην κατηγορία 4. 1639 (93.7%) νεοσύλλεκτοι εμφάνισαν TST 0mm. Για λόγους λειτουργικότητας έγινε τυχαία επιλογή 18 εξ αυτών, ώστε να αποτελέσουν την αρνητική ομάδα ελέγχου της μελέτης.

Με τη μέθοδο QuantiFERON TB Gold in tube παρατηρήθηκαν θετικά αποτελέσματα σε 11 από τους 96 συμμετέχοντες που εμφάνιζαν θετική Mantoux (11.4%), ενώ δεν σημειώθηκαν ενδιάμεσα αποτελέσματα. Όταν η ομαδοποίηση έγινε με βάση την τιμή της TST παρατηρήθηκαν τα εξής: Από τους νεοσύλλεκτους με τιμή TST: 1-9 mm 1 στους 14 παρουσίαζαν θετικό αποτέλεσμα QFT-GIT, με τιμή TST:10-14 mm κανένας από τους 36 δεν παρουσίαζε θετικό αποτέλεσμα και ανάμεσα σε αυτούς με TST  $\geq 15$ mm θετικοί ήταν οι 11 από τους 57. Από τα άτομα που αποτελούσαν την αρνητική ομάδα ελέγχου (TST: 0

mm) 1 στους 18 εμφάνισε θετικό αποτέλεσμα μη τη μέθοδο QuantiFERON TB Gold in tube.

Επίσης, κατά τη μελέτη της επίδρασης του χρονικού διαστήματος που παρήλθε από τον εμβολιασμό με BCG στη τιμή της TST δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην παραπάνω τιμή ανάμεσα στα άτομα που είχαν εμβολιαστεί 9-14 χρόνια πριν και σε αυτά που είχαν εμβολιαστεί 15-29 χρόνια πριν την εφαρμογή της Mantoux, γεγονός που καταδεικνύει ότι η επίδραση του εμβολιασμού στην TST είναι μακράς διάρκειας.

Στη μελέτη μας, σε πληθυσμό με ιστορικό εμβολιασμού με BCG στην παιδική ηλικία, παρατηρήθηκε σημαντική ασυμφωνία ανάμεσα στα αποτελέσματα της δερμοαντίδρασης Mantoux και των τεχνικών απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$ .

Αποκλείσαμε άλλες πιθανές, εκτός του εμβολιασμού, αιτίες της ασυμφωνίας των δυο μεθόδων, γεγονός που καταδεικνύει ότι ο εμβολιασμός με BCG επιδρά στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της φυματινοαντίδρασης Mantoux ενώ αφήνει ανεπηρέαστα τα αποτελέσματα των τεχνικών απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$ .

Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο εμβολιασμός με BCG είναι υποχρεωτικός στην Ελλάδα και πραγματοποιείται μετά τη νηπιακή ηλικία, οπότε η επίδραση του στην τιμή της Mantoux, σύμφωνα με έρευνες είναι ουσιαστική, η προσέγγιση με δυο βήματα στην προσπάθεια ανίχνευσης νεαρών ενήλικων με λανθάνουσα φυματίωση κρίνεται πιο αξιόπιστη. Οι νεαροί ενήλικες, με ιστορικό εμβολιασμού με BCG, πρέπει να εξετάζονται με τη μέθοδο Mantoux και αυτοί που εμφανίζουν τιμές ίσες ή μεγαλύτερες από 10 mm πρέπει να εξετάζονται και με τη μέθοδο IGRA. Θεραπεία για λανθάνουσα φυματίωση θα πρέπει να λάβουν μόνο όσοι από αυτούς παρουσιάζουν θετικά αποτελέσματα με τη μέθοδο IGRA, ώστε να αποφευχθούν οι παρενέργειες, η οικονομική επιβάρυνση και η ψυχολογική φθορά από μια ανώφελη θεραπεία.

Σκοπός της δεύτερης φάσης της παρούσας μελέτης ήταν συσχέτιση των αποτελεσμάτων της μεθόδου QuantiFERON TB Gold in tube και της μεθόδου Mantoux στην ανίχνευση της λανθάνουσας φυματίωσης σε ηλικιωμένους που διέμεναν σε γηροκομείο και ήρθαν σε άμεση επαφή με άτομο που έπασχε από ενεργό φυματίωση καθώς και η εκτίμηση της πρόσθετης αξίας των πρόσφατα ανεπτυγμένων τεχνικών απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$ .

Στη μελέτη έλαβαν μέρος συνολικά 77 άτομα, τα οποία είχαν συνεχή επαφή με τρόφιμο του γηροκομείου που νοσούσε με ενεργό φυματίωση και συγκεκριμένα είχαν εκτεθεί σε αυτή περισσότερο από 40 ώρες πριν τη διάγνωση της νόσου. Οι συμμετέχοντες

χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Την πρώτη ομάδα αποτελούσαν οι 63 ηλικιωμένοι ένοικοι του γηροκομείου με μέσο όρο ηλικίας τα  $82 \pm 10$  έτη ενώ η δεύτερη ομάδα συμπεριλάμβανε 14 νεαρούς εργαζόμενους με μέσο όρο ηλικίας  $41.2 \pm 9.2$  έτη. Όλα τα άτομα υπεβλήθησαν σε δερμοαντίδραση Mantoux ενώ είχαν παρέλθει περισσότεροι από 2 μήνες από την πρώτη επαφή με την ασθενή τρόφιμο. Βάσει των τιμών της TST οι ομάδες των ηλικιωμένων και των εργαζόμενων ταξινομήθηκαν σε δυο υποομάδες. Η υποομάδα 1 συμπεριλάμβανε τα άτομα με θετική τιμή TST και η υποομάδα 2 τα άτομα με αρνητική τιμή TST. Θετικές θεωρήθηκαν οι τιμές της TST που ήταν ίσες ή μεγαλύτερες από 5mm βάσει των οδηγιών της American Thoracic Society. Οι συμμετέχοντες που εμφάνισαν αρνητική τιμή TST (<5mm) εκτιμήθηκαν με τη χρήση των τεχνικών απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ (IGRA) και συγκεκριμένα της δοκιμασίας QuantiFERON TB Gold in tube, η οποία εκτελέστηκε την ημέρα ανάγνωσης της TST, δηλαδή 72 ώρες μετά την πραγματοποίηση της Mantoux. Από τους ηλικιωμένους ενοίκους του οίκου ευγηρίας οι 20 (31.7%) εμφάνιζαν θετική δερμοαντίδραση Mantoux ( $\geq 5$ mm) ενώ από τους εργαζόμενους 6 άτομα (43%) εμφάνιζαν θετική Mantoux με μέση τιμή  $5.5 \pm 9.3$  mm και  $5.8 \pm 7.9$  mm αντίστοιχα. Όλοι υποβλήθηκαν σε θεραπεία για λανθάνουσα φυματίωση, μετά από εξονυχιστική διερεύνηση προκειμένου να αποκλεισθεί η ενεργός νόσος. Από τα 51 άτομα του υπό μελέτη πληθυσμού που εμφάνισαν αρνητική τιμή της δερμοαντίδρασης Mantoux τα 43 ανήκαν στους ηλικιωμένους ενοίκους και τα 8 στους εργαζόμενους στο γηροκομείο και όλα εκτιμήθηκαν περαιτέρω με τη χρήση της τεχνικής QuantiFERON TB Gold in tube. Θετικά αποτελέσματα σημειώθηκαν σε 8 άτομα με αρνητική τιμή TST αυξάνοντας το ποσοστό των ατόμων με πιθανή λανθάνουσα φυματίωση από 31.7%, όπως είχε υπολογιστεί μόνο με τη χρήση της φυματινοαντίδρασης Mantoux σε 42.9% όταν ελήφθησαν υπόψη τα θετικά αποτελέσματα της Mantoux ή του QuantiFERON TB Gold in tube. Από τους ενοίκους του γηροκομείου που εμφάνιζαν θετικά αποτελέσματα με τη μέθοδο QuantiFERON TB Gold in tube το 14% ήταν ηλικίας κάτω των 80 ετών, ενώ το 86% ήταν άνω των 80 ετών. Η μέση τιμή των επιπέδων ιντερφερόνης-γ στα άτομα με θετικά αποτελέσματα της τεχνικής απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ ήταν  $1.47 \pm 1.04$  IU/ml.

Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι οι τεχνικές απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ παρουσιάζουν την ικανότητα ανίχνευσης νόσου σε άτομα που εμφανίζουν ανεργία με τη μέθοδο της TST. Στην παρούσα μελέτη με την άμεση εφαρμογή του QuantiFERON TB Gold in tube ανευρέθησαν επτά άτομα με αρνητική τιμή TST αλλά θετικά αποτελέσματα QuantiFERON TB Gold in tube αυξάνοντας το ποσοστό της

λανθάνουσας φυματίωσης από 31.7% σε 42.9%. Σε αυτά τα επτά άτομα δεν θα είχε γίνει η διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης αν δεν είχαν χρησιμοποιηθεί οι τεχνικές IGRA ή η διάγνωση θα είχε καθυστερήσει εν αναμονή των αποτελεσμάτων της δεύτερης φυματινοαντίδρασης Mantoux με τη διαδικασία των δυο βημάτων.

Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα στη παραπάνω μελέτη είναι ότι ανευρέθησαν αρνητικά αποτελέσματα με την τεχνική IGRA σε ηλικιωμένα άτομα με αρνητική Mantoux και ευρήματα συμβατά με ινωτικές βλάβες στην ακτινογραφία θώρακα, τα οποία σύμφωνα με τις οδηγίες της ATS θα ελάμβαναν αγωγή για λανθάνουσα φυματίωση. Λαμβάνοντας υπόψη τη μεγαλύτερη συχνότητα των παρενεργειών της αντιφυματικής αγωγής στους ηλικιωμένους, τα παραπάνω αποτελέσματα βοήθησαν ώστε να αποφευχθεί ανώφελη θεραπεία.

Η ταυτόχρονη χρήση των τεχνικών απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$  και της μεθόδου Mantoux, στον έλεγχο ηλικιωμένων ατόμων που έχουν έρθει σε επαφή με άτομο που νοσεί από ενεργό φυματίωση προτείνεται ως η πιο αξιόπιστη και ταχύτερη εναλλακτική πρακτική αντί της εφαρμογής της Mantoux σε δυο βήματα. Η παραπάνω πρακτική μαζί με την ανάπτυξη πολιτικής πρόληψης και παρακολούθησης μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση της επίπτωσης της φυματίωσης στα ιδρύματα.

## 6. SUMMARY

### **Comparison of interferon- $\gamma$ release assays (IGRAs) and tuberculin skin test (TST) for the diagnosis of latent tuberculosis infection (LTBI) in high-risk population groups for developing active tuberculosis.**

Tuberculosis (TB) remains one of the most fatal infectious diseases worldwide, accounting for more than 2 million deaths annually. One-third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* while World Health Organization estimates a prevalence of 19 new cases/ 100 000/ year in Greece, among the highest in Western Europe. A critical step in the elimination of tuberculosis would be the prompt diagnosis of latent tuberculosis.

For more than a century and until recently, Mantoux has been the only method for the assessment of infection with the *Mycobacterium* of tuberculosis. The above technique has some drawbacks, the most important of which is the occurrence of false positive results due to infection with non-tuberculous mycobacteria or after the vaccination with BCG, that has as a result the application of unnecessary treatment.

A major breakthrough in recent years has been the development of new techniques, called interferon- $\gamma$  release assays. With the above techniques, T cell release of interferon- $\gamma$  in response to stimulation to antigens specific for the *Mycobacterium* of tuberculosis, is measured. Two assays have become commercially available: QuantiFERON –TB Gold assay and T-SPOT. TB.

A major challenge is the prompt diagnosis and treatment of tuberculosis in the elderly who are at increased risk of incurring TBC reactivation due to the impairment of cell immunity and the co-existence of acute or chronic diseases.

In Greece, a large percentage of geriatric population lives in nursing homes. There have been only a few studies investigating the effect of contact with people suffering from active tuberculosis in such settings while there are no explicit and unified recommendations in regard policies and practices of TB screening among elderly residents and staff working in nursing homes.



In Greece there have been no studies comparing the efficacy of interferon- $\gamma$  release assays and Mantoux in BCG vaccinated populations and estimating the value of IGRA in the diagnosis of latent tuberculosis in the elderly.

The aim of the first phase of the present study is to compare Mantoux and the interferon- $\gamma$  release assays, in particular Quantiferon TB Gold in tube assay, in Greek Army recruits that have been vaccinated with BCG in their childhood and had not been exposed to tuberculosis in the past. We also studied the effect on TST of the interval since BCG vaccination.

Of 56368 subjects who enlisted at all recruitment centers throughout Greece 1765 were enrolled in our study. We excluded 15 recruits with chronic medical conditions, because of receiving treatment for either active or latent tuberculosis, and due recent exposure to patients suffering from active tuberculosis. A total number of 1750 recruits were finally enrolled in our study. Of a total of 1750 subject 96 (5.4%) were TST-positive with an induration size  $\geq 10$  mm. The 111 participants with TST $\geq 0$  mm were divided in four groups according to the defined TST grouping values. The first group included subjects with TST induration 1-4 mm the second group with TST 5-9mm, the third group with 10-14mm and the fourth included recruits with  $\geq 15$  mm. From the participants, one subject (0.9%) had an induration size of 1-4 mm, 14 subjects (12.6%) had a TST result of 5-9 mm, 37 subjects (33.3%) had an induration size of 10-14 mm and 59 recruits (53.2%) had a TST result of  $\geq 15$  mm. 1639 (93.7%) recruits had a TST of 0 mm. For reasons of functionality, only a subgroup of 18 subjects with a TST of 0 mm was selected through randomization to constitute a negative-control group. Positive QFT-GIT results were observed in 11 of the 96 recruits who were positive by TST (11.4%) while there were no indeterminate results. When we grouped the recruits according to TST results, we found that among recruits with TST:1-9 mm 1 out of 14 was positive by QFT-GIT, among those with TST:10-14 mm QFT-GIT was negative in all of them (0/36 subjects), and among those with TST  $\geq 15$  mm QFT-GIT was positive in 11/57. One out of 18 negative-control subjects with TST result of 0 mm was positive by QFT-GIT.

At the study of the effect on TST of the interval since BCG vaccination, no statistical significance was found between the group vaccinated 9-14 years before and the group vaccinated 15-29 years before suggesting that the effect of BCG on TST is long lasting.

Our study demonstrated a significant discordance between Mantoux and interferon- $\gamma$  release assays.

We excluded other potential causes of the discordance between the two methods, such as exposure to non tuberculous mycobacteria or low IGRA sensitivity due to false negative results demonstrating the effect of BCG on TST and the fact that the results of interferon- $\gamma$  release assays remain unaffected.

Based on the fact that vaccination with BCG in Greece is mandatory and received at the age of six years old, when BCG effect on TST is substantial, a two-step approach to identify young adults with LTBI seems to be more reliable. All BCG vaccinated young adults should be screened with TST and those with TST indurations of 10 mm or more should undergo an IGRA test. Only those with positive IGRA results should be treated for LTBI in order to avoid treatment side effects, economical and psychological burden, due to an unnecessary treatment.

The aim of the second phase of the present study was to assess the additive value of a newly marketed interferon- $\gamma$  release assay, QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT), to the tuberculin skin test (TST) for the detection of latent tuberculosis infection (LTBI) among elderly TB contacts in a nursing home.

A total of 77 individuals participated in this study. The participants were in continuous contact with the infected resident of the nursing home and specifically they were exposed to the index case for more than 40 hours prior to the diagnosis. They were divided into two groups. Group A consisted of 63 elderly people, residents of the nursing home with mean age  $82 \pm 10$  years old while Group B consisted of 14 younger employees with mean age  $41.2 \pm 9.2$  years old. All these contacts underwent TST more than 2 months after their first exposure to the case. According to the induration size of TST the two groups were subdivided in two subgroups. The subgroup 1 consisted of the participants with positive TST results and the subgroup 2 of those with negative TST results. According to American Thoracic Society positive TST values of  $\geq 5$ mm were judged positive as estimated by using the ballpoint pen-ruler method. Contacts with negative TST ( $< 5$ mm) were evaluated with QFT-GIT. The QFT-GIT was performed at the day of TST reading, that is after 72 hours after TST performing. 20/63(31.7%) of the elderly residents had positive TST ( $\geq 5$ mm) compared to 6/14(43%) of young employees with mean induration size of  $5.5 \pm 9.3$  mm και  $5.8 \pm 7.9$  mm respectively. All of them were treated for LTBI after

meticulous examination to exclude active TB. Positive QFT-GIT results were observed in 7/43(16.3%) of the elderly residents with negative TST increasing the percentage of individuals with possible LTBI from 31.7% regarding positive TST to 42.9% regarding either positive TST or IGRA. The rate of positive QFT-GIT in those under 80 years old was 14% (1/7) which amounted to 86% (6/7) in those over 80 years old.

The results of this study show that interferon- $\gamma$  release assays demonstrate an additive value in detecting LTBI in subjects that present anergy with TST method. The present study revealed seven subjects with negative TST results but positive IGRA results increasing the percentage of latent tuberculosis from 31.7% to 42.9%. If the interferon- $\gamma$  release assays have not been used there would be no diagnosis of latent tuberculosis in these seven subjects or the diagnosis would be delayed pending the results of the second Mantoux, according to the two steps procedure.

Another interesting finding of our study was that QFT-GIT results were negative in TST negative elderly contacts with fibrotic-appearing lesions on their chest radiographs. These subjects would have received “preventive” therapy, according to ATS guidelines concerning groups of individuals at greater risk of tuberculosis. However, IGRA obviated the need of LTBI treatment in those elderly individuals prone to side effects of treatment since negative results were observed.

The simultaneous use of interferon- $\gamma$  release assays and Mantoux for the detection of LTBI among elderly individuals in contact with an active TBC contact seem to be most reliable and faster practice than two step Mantoux implementation. The above practice along with the development of prevention policies will lead to the decrease of tuberculosis incidence in nursing homes.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### 7.1 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΓΕΝΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

1. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 1995;64:29-63
2. Glickman MS, Cox JS, Jacobs WR. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for coding persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell* 2000;5:717-27
3. Geisel RE, Sakamoto K, Russel DG, Rhoades ER. In vivo activity of released cell wall lipids of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin is due principally to trehalose mycolates. *J Immunol* 2005;174:5007-5015
4. Rook GAW, Zumla A. Advances in the immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Pulmon Med* 2001;7:116-23
5. Ratledge C. Iron, mycobacteria and tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2004;84:110-30
6. World Health Organization. Global tuberculosis control: Surveillance, planning, financing. Geneva: World Health Organization 2007
7. Euro TB and the National Coordinators for Tuberculosis Surveillance in the WHO European Region. Surveillance of tuberculosis in Europe. Report on tuberculosis cases notified in 2005. Paris: Institut de Veille Sanitaire, 2007
8. Borgdorff MW, Nagelkerke NJ, Dye C, Nunn P. Gender and tuberculosis: a comparison of prevalence surveys with notification data to explore sex differences in case detection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:123-32
9. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL. Global burden of disease and risk factors. New York: Oxford University Press/ The World Bank, 2006
10. Styblo K. Epidemiology of tuberculosis, 2nd edition. The Hague:KNCV Tuberculosis Foundation, 1991
11. Rieder HL. Epidemiologic basis of tuberculosis control, 1<sup>st</sup> edn. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 1999

12. Joshi R, Reingold AL, Menzies D, Pai M. Tuberculosis among health-care workers in low and middle- income countries:a systematic review. *PLoS Med* 2006;3:e494
13. Stevenson CR, Forouhi NG, Roglic G et al. Diabetes and tuberculosis: the impact of the diabetes epidemic on tuberculosis incidence. *BMC Public Health* 2007;7:234
14. Corbett EL, Churchyard GJ, Clayton T et al. Risk factors for pulmonary mucobacterial disease in South African gold miners. A case control study. *Am J respire Crit Care Med* 1999;159:94-9
15. Cegielsky JP, Mc Murray DN. The relationship between malnutrition ant tuberculosis: evidence from studies in humans and experimental animals. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8;286-98
16. Lin HH, Ezzati M, Murray M. Tobacco smoke, indoor air pollution and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2007;4:e20
17. Fernando SL, Britton WJ. Genetic susceptibility to mucobacterial disease in humans. *Immunol Cell Biol* 2006;84:125-37
18. Centers for Disease Control and Prevention. Tuberculosis associated with blocking agents against tumor necrosis factor-alpha- California, 2002-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004;53:683-6
19. Ellis SM. The spectrum of tuberculosis and non-tuberculous mucobacterial infection. *Eur Radiol* 2004;14(suppl.3):E34-42
20. Geng E, Kreisweirth B, Burzynski J et al(2005). Clinical and radiographic correlates of primary and reactivation tuberculosis:a molecular epidemiology study. *J Am Med Assoc* 2005;293:2740-5
21. Jacubowiak W. Tb manual national tuberculosis programme guidelines Geneva:World Health Organization, 2001
22. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children, 1999. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1376-95
23. Morgan MA, Horstmeier CD, De Young DR et al. Comparison of a radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mucobacteria from smear-negative specimens. *J Clin Microbiol* 1983;18:384-8

24. Konchana MV, Cheke D, Natyshak I et al. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for the recovery of mucobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;37:31-6
25. Sharp SE, Lemes M, Erlich SS et al. A comparison of the BACTEC 9000MB system and the Septi-Chek AFB system for the detection of mucobacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;28:69-74
26. Hensler NM, Spirey CG Jr, Dees TM. The use of hypertonic aerosol in production of sputum for diagnosis of tuberculosis. Comparison with gastric specimens. *Dis Chest* 1961;40:639-42
27. Carr DT, Karlson AG, Stilwell GG. A comparison of cultures induced sputum and gastric washings in the diagnosis of tuberculosis. *Mayo Clinic Proc* 1967;42:23-5
28. Chawla R, Pant K, Jaggi OP et al. Fibreoptic bronchoscopy in smear-negative pulmonary tuberculosis. *Eur respire J* 1988;1:804-806
29. Dalovisio JR, Montenegro –James S, Kemmerly SA et al. Comparison of the amplified Mycobacterium Tuberculosis (MTB) direct test, AMPLICOR MTB PCR, and IS6110-PCR for detection of MTB in respiratory specimens. *Clin Infect Dis*, 1996;23:1099-106; discussion1107-108
30. Piersimoni C, Scarparo C, Picolli P et al. performance assessment of two commercial amplification assays for direct detection of Mucobacterium Tuberculosis complex from respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40:4138-42
31. Cameron E.W.J. Tuberculosis and mediastinoscopy. *Thorax* 1978;33:117
32. QuantiFERON-TB Gold. The whole blood IFN-gamma test measuring responses to ESAT-6 and CFP-1 peptide antigens. Cellestis Package Insert: Cellestis Ltd(Australia)and Cellestis Inc.(USA)
33. T-Spot.TB. An aid in the diagnosis of tuberculosis infection. Package insert for in vitro diagnostic use. Oxford:Oxford Immunotech, 2006
34. Ludon R.G, Spohn S.K. Cough frequency and infectivity in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1969;99:109-111
35. Ludon R.G, Bumgarner L.R, Lacy J et al. Aerial transmission of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1969;100:165-171

36. Centers for Disease Control and Prevention, Division of Tuberculosis Elimination: Tuberculosis Statistics in the United States. Atlanta: Centers for Disease control and Prevention, 1994
37. Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W- Beijing family strains. *Trends microbial* 2002;10:45-52
38. Richardson M, van Lill SW, van der Spuy GD et al. Historic and recent events contribute to the disease dynamics of Beijing-like *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a high incidence region. *Int J Tuberc lung Dis* 2002;6:1001-11
39. Lopez B, Aguilar D, Orozco H et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 2003;133:30-7
40. Victor TC, Streicher EM, Kewley C et al. Spread of an emerging *Mycobacterium tuberculosis* drug- resistant strain in the Western Cape of South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:195-201
41. Burgos M, DeRiemer K, Small PM et al. Effect of drug-resistance on the generation of secondary cases of tuberculosis. *J Infect Dis* 2003;188:1874-84
42. Hamadeh M A, Glassroth J. Tuberculosis and pregnancy. *Chest* 1992;101:1114-1120
43. Ormerod P. Tuberculosis in pregnancy and the puerperium. *Thorax* 2001;56:494-499
44. Schaefer G, Zervoudakin IA, Fuchs FF et al. Pregnancy and pulmonary tuberculosis. *Obstet Gynaecol* 1975;46:706-15
45. Barboza CE, winter DH et al. Tuberculosis and silicosis: epidemiology, diagnosis and chemoprophylaxis. *J Bras Pneumol* 2008 Nov;34(11):959-66
46. Story A, Murad S, Roberts W et al. Tuberculosis in London: the importance of homelessness, problem drug use and prison. *Thorax* 2007 Aug;62(8):667-71
47. Lönnroth K, Williams BG, Stadin S et al. Alcohol use as a risk factor for tuberculosis- a systematic review. *BMC Public Health* 2008 Aug 14;8:289
48. Bates MN, Chalakdina A, Pai M et al. Risk of tuberculosis from exposure to tobacco smoke: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007 Feb 26;167(4):335-42

49. Nava-Aguilera E, Andersson N, Harris E et al. Risk factors associated with recent transmission of tuberculosis: systematic review and meta-analysis. Int J Tuberc Lung Dis. 2009 Jan;13(1):17-26
50. Sonnenberg P, Glynn JR, Fielding K et al. How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African Gold Miners. J Infect Dis 2005;191:150-8
51. Corbett EL, Watt CJ, Walker N et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. Arch Intern Med 2003;163:1009-21
52. Tubach F, Salmon D, Ravaud P et al. Risk of tuberculosis is higher with anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody therapy than with soluble tumor necrosis factor receptor therapy: The three-year prospective french research axed on tolerance of biotherapies registry. Arthritis Rheum. 2009 Jul;60(7):1884-94
53. Fuchs-Polychuck I, Avnon LS, Abu-Shakra M. Tuberculosis among patients treated with TNF-alpha blockers. Harefuah. 2007 Mar;146 (3):212-8, 245.
54. Miller EA, Ernst JD. Anti-TNF immunotherapy and tuberculosis reactivation: another mechanism revealed. J Clin Invest 2009;119:5:1079-82
55. Mok MY, Lo Y, Chan TM, Wong WS, Lau CS. Tuberculosis in systemic lupus erythematosus in an endemic area and the role of isoniazid prophylaxis during corticosteroid therapy. J Rheumatol 2005;32:609-15
56. Naqvi A, Rizvi A, Hussain Z et al. Developing world perspective of post-transplant tuberculosis: morbidity, mortality and cost implications. Transplant Proc 2001;33:1787-8
57. Jeon c, Murray M. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: A systematic review of 13 Observational Studies. PLoS Med 2008;5:7:e152
58. Yokoyama T, Sato R, Rikimaru T et al. Tuberculosis associated with gastrectomy. J infect Chemother 2004; 10:5:299-302
59. Bates JH. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. Clin Chest Med 1980;1:167-74
60. Ernst JD. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 1998;66:1277-81



61. Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement components C3. *J Immunol* 1990;144:2771-80
62. Cywes C, Hoppe HC, Daffe M et al. Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent. *Infect Immun* 1997;65:4258-66
63. Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA et al. CD-I restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 1995;269:227-30
64. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-76
65. Krutzik SR, Sieling PA, Modlin RL. The role of Toll-like receptors in host defense against microbial infection. *Curr Opin Immunol* 2001;13:104-8
66. Boom WH, Canaday DH, Fulton SA et al. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. *Tuberculosis (Edinb)* 2003;83:98-106
67. Tena GN, Young DB, Eley B et al. Failure to control growth of *Mycobacterium tuberculosis* in blood from children infected with human immunodeficiency virus and its relationship to T cell function. *J Infect Dis* 2003;187:1544-51
68. Serbina NV, Lazarevic V, Flynn JL. CD4 (+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8(+) T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 2001;167:6991-7000
69. Silver RF, Li Q, Boom WH, Ellner JJ. Lymphocyte-dependent inhibition of growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv within human monocytes: requirement for CD4 (+) T cells in purified protein derivative-positive, but not in purified protein derivative-negative subjects. *J Immunol* 1998;160:2408-17
70. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME et al. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 1983;158:670-89
71. Smith SM, Klein MR, Mallin AS et al. Human CD8 (+) T cells specific for *Mycobacterium tuberculosis* secreted antigens in tuberculosis patients and healthy BCG- vaccinated controls in the Gambia. *Infect Immun* 2000;68:7144-8

72. Carranza C, Juarez E, Torres M et al. *Mycobacterium tuberculosis* growth control by lung macrophages and CD8 cells from patient contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;173:238-45
73. Canaday DH, Wilkinson RJ, Li Q et al. CD4 (+) and CD8(+) T cells kill intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. *J Immunol* 2001;167:2734-42
74. Teitelbaum R, Glatman-Freedman A, Chen B et al. A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15688-93
75. Costello AM, Kumar A, Narayan V et al. Does antibody to mycobacterial antigens, including lipoarabinomannan, limit dissemination in childhood tuberculosis? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992;86:686-92
76. Hussain R, Shiratsuchi H, Phillips M et al. Opsonizing antibodies (IgG1) up-regulate monocyte proinflammatory cytokines, tumor necrosis factor- alpha (TNF- $\alpha$ ) and IL-6 but not anti-inflammatory cytokine IL-10 in mycobacterial antigen-stimulated monocytes-implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 2001;123:210-8
77. Bothamley GH, Rudd R, Festenstein F, Ivanyi J. Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody in pulmonary tuberculosis. *Thorax* 1992;47:270-5
78. Davidow A, Kanaujia GV, Shi L et al. Antibody profiles characteristic of *Mycobacterium tuberculosis* infection state. *Infect Immun* 2005;73:6846-51
79. Bothamley GH. Serological diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J* 1995;20(Suppl):676s-88s
80. Ridley DS, Ridley MJ. Rationale for the histological spectrum of tuberculosis. A basis for classification. *Pathology* 1987;19:186-92
81. Dannenberg AM. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today* 1991;12:228-33
82. Seitzer U, Szeel-Toellner D, Toellner K-M et al. Properties of multinucleated giant cells in a new in vitro model for human granuloma formation. *J Pathol* 1997;182:99-105

83. Lay G, Poquet Y, Salek- Peyron P et al. Langhans giant cells from *Mycobacterium tuberculosis*- induced human granulomas cannot mediate mycobacterial uptake. *J Pathol* 2007;211:76-85
84. van den Oord JJ, De Wolf-Peeters C, Facchetti F, Desmet VJ. Cellular composition of hypersensitivity-type granulomas: immunocytochemical analysis of tuberculous and sarcoidal lymphadenitis. *Hum Pathol* 1984;15:559-65
85. Zhang M, Gong J-H, Iyer DV, Jones BE, Modlin RL, Barnes PF. T-cell cytokine responses in persons with tuberculosis and HIV infection. *J Clin Invest* 1994;94:2435-42
86. Cooper AM, D'Souza C, Frank AA, Orne IM. The course of *Mycobacterium tuberculosis* infection in the lungs of mice lacking expression of either perforin- or granzyme-mediated cytolytic mechanisms. *Infect Immun* 1997;65:1317-20
87. Fayyazi A, Eichmeyer B, Soruri A et al. Apoptosis of macrophages and T- cell in tuberculosis associated caseous necrosis. *J Pathol* 2000;191:417-25
88. Dannenberg AM, Rook GAW. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses- dual mechanisms that control bacillary multiplication. In: Bloom BR (ed.). *Tuberculosis pathogenesis, protection and control*. Washington: American Society for Microbiology, 1994:459-83
89. National Collaborating Centre for Chronic Conditions. *Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control*. London: Royal College of Physicians, 2006
90. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS et al. The spectrum of disease in children treated for tuberculosis in a highly endemic area. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10:732-8
91. Alexander WJ, Avent CK, Bailey WC. Simple primary tuberculosis in an elderly woman. *J Am geriatr Soc* 1979;27:123-5
92. Stead WW, Kerby GR, Schlueter DP, Jordahl CW. The clinical spectrum of primary tuberculosis in adults. Confusion with reinfection in the pathogenesis of chronic tuberculosis. *Ann Intern Med* 1968;68:731-45
93. Madkour MM. Primary tuberculosis in adults. In: Madkour MM (ed). *Tuberculosis 1<sup>st</sup> edn*. Berlin: Springer, 2004:265-70

94. Roper WH, Waring JJ. Primary serofibrinous pleural effusion in military personnel. *Am J Tuberc* 1955;71:616-34
95. Andreu J, Canceres J, Pallisa E, Martinez-Rontriguez M. Radiological manifestations of pulmonary tuberculosis. *Eur J Radiol* 2004;51:139-49
96. English RG, Bachmann MO, Bateman ED et al. Diagnostic accuracy of an integrated respiratory guideline in identifying patients with respiratory symptoms requiring screening for pulmonary tuberculosis: a cross-sectional study. *BMC Pulm Med* 2006;6:22
97. Den BS, White NW, van Lill SW et al. An evaluation of symptom and chest radiographic screening in tuberculosis prevalence surveys. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10:876-82
98. Al Shahed M, Abdel Bagi M, Madkour MM. Radiology of pulmonary tuberculosis. In: Madkour MM (ed). *Tuberculosis 1<sup>st</sup> edn*. Berlin:Springer, 2004:359-84
99. Grzybowski S, Barnett GD, Styblo K. Contacts of cases of active pulmonary tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc* 1975;50:90-106
100. Fraser RS, Muller NL, Colman N, Pare PD. *Diagnosis of diseases of the chest*, 4<sup>th</sup> edn. Philadelphia: Saunders, 1999
101. Rossi SE, Franquet T, Volpacchio M et al. Tree-in bud pattern at thin-section CT of the lungs: radiologic-pathologic overview. *Radiographics* 2005;25:789-801
102. Geng E, Kreisweirth B, Burzynski J, Schluger NW. Clinical and radiographic correlates of primary and reactivation tuberculosis: a molecular epidemiology study. *J Am Med Assoc* 2005;293: 2740-5
103. Campbell IA, Dyson AJ. Lymph node tuberculosis: a comparison of various methods of treatment. *Tubercle* 1977;58:171-9
104. Davies PDO, Humphries MJ, Byfield SP et al. Bone and joint tuberculosis in a national survey in England and Wales in 1978/9. *J Bone Joint Surg* 1984;66: 326-30
105. Humphries MJ, Sister Gabriel M, Lee YK. Spinal tuberculosis presenting as abdominal symptoms- a report of two cases. *Tubercle* 1986;67:303-307
106. Houshian S, Poulsen S, Riegels-Nielsen P. Bone and joint tuberculosis in Denmark: increase due to immigration. *Acta Orthop Scand* 2000;71:312-15

107. Hodgson SP, Ormerod LP. Ten year experience with bone and joint tuberculosis in Blackburn 1978-87. *J Roy Coll Surg Edin* 1990;35:259-62
108. Mukherjee P, Signal AK. Intestinal tuberculosis: 500 operated cases. *Proc Assoc Surg East Africa* 1979;2:70-5
109. Klimach OE, Ormerod LP. Gastrointestinal tuberculosis: a retrospective review of 109 cases in a district general hospital. *Quart J Med* 1985;56:569-78
110. Lambrianides AL, Ackroyd N, Shorey B. Abdominal tuberculosis. *Br J Surg* 1980;67: 887-9
111. Ferrie BG, Rundle JSH. Genitourinary tuberculosis in patients under 25 years of age. *Urology* 1985;25:576-8
112. Datta SK. Renal tuberculosis presenting as hypertension. *J Assoc Phys India* 1987;35:798-9
113. Benn JJ, Scoble JE, Thomas AC, Eastwood JB. Cryptogenic tuberculosis presenting as a preventable cause of end-stage renal failure. *Am J Nephrol* 1988;8:306-8
114. Morgan SH, Eastwood JB, Baker LRI. Tuberculous interstitial nephritis- the tip of an iceberg? *Tubercle* 1990;71:5-6
115. Gorse GJ, Belshe RB. Male genital tuberculosis: a review of the literature with instructive case reports. *Rev Infect Dis* 1985;7:511-14
116. Sutherland AM. Gynaecological tuberculosis; analysis of a personal series of 710 cases. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 1985;25:203-207
117. Sardana K, Koranne RV, Sharma RC, Mahajan S. Tuberculosis of the vulva masquerading as a sexually transmitted disease. *J Dermatol* 2001;28:505-7
118. Teoh R, Humphries MJ, Chan JCN et al. Internuclear ophthalmoplegia in tuberculous meningitis. *Tubercle* 1989;70:61-4
119. Wadia NH, Dastur DK. Spinal meningitis with radiculomyelopathy. Part I: clinical and radiological features. *J Neurol Sci* 1969;8:239-60
120. Kumar B, Rai R, Kaur I et al. Childhood cutaneous tuberculosis: a study over 25 years from northern India. *Int J Dermatol* 2001;40:26-32
121. Kumar B, Muralidhar S. Cutaneous tuberculosis: A twenty-year prospective study. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3:494-500
122. Fowler NO. Tuberculous pericarditis. *J Am Med Assoc* 1991;268:99-103
123. Strang JIG. Tuberculous pericarditis in Transkei. *Clin Cardiol* 1984;7:667-70

124. Bashi W, John S, Ravindakumar H et al. Early and late results of pericardectomy in 118 cases of constrictive pericarditis. *Thorax* 1988;43:637-41
125. Sagrosta-Sauleda J, Permanyer- Miralda G, Soler-Soler J. Tuberculous pericarditis: a ten-year experience with a prospective protocol for diagnosis and treatment. *J Am Coll Cardiol* 1988;11:724-8
126. Llewelyn M, Adler M, Steer K, Pasvol G. Acute adrenal insufficiency precipitated by isolated involvement of the adrenal gland by tuberculosis. *J Infect* 1999;39:244-5
127. Lam KY, Lo CY. A critical examination of adrenal tuberculosis and a 28-year autopsy experience of active tuberculosis. *Clin Endocrinol* 2001;54:633-9
128. Nagai H, Shimizu S, Kawamoto H et al. A case of solitary tuberculosis of the liver. *Jpn J Med* 1989;28:251-5
129. Gibson JA. Granulomatous liver disease and portal hypertension. *Proc Roy Soc Med* 1973;66:502-3
130. Sheen-Chen SM, Chou FF, Tai DI, Eng HL. Hepatic tuberculosis: a rare cause of bleeding gastric varices. *Tubercle* 1990;71:225-7
131. Rahmatulla RH, al-Mofleh IA, al-Rashed RS et al. Tuberculous liver abscess: a case report and review of the literature. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:437-40
132. Demir K, Kaymakoglou S, Besisik F et al. Solitary pancreatic tuberculosis in immunocompetent patients mimicking pancreatic carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1071-4
133. Monie RDH, Hunter AM, Rocchiccioli KMS et al. Retrospective survey of the management of miliary tuberculosis in South and West Wales 1976-78. *Thorax* 1993;38:369-73
134. Sahn SA, Neff TA. Miliary tuberculosis. *Am J Med* 1968;56:495-505
135. Medical Research Council. A Medical Research Council Investigation. Treatment of pulmonary tuberculosis with streptomycin and para-aminosalicylic acid. *Br Med J* 1950;ii:1073-85
136. Medical Research Council. Various combinations of isoniazid with streptomycin or PAS in the treatment of pulmonary tuberculosis. Seventh report

- to the Medical Research Council by their tuberculosis Chemotherapy Trials Committee. *Br Med J* 1955;i:434-45
137. Fox W, Mitchison D. Short-course chemotherapy for pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1975;111:845-8
  138. Burman WJ, Peloquin CA. Isoniazid. In: Yu VL, Edwards G, McKinnon PS, Peloquin C, Morse GD(eds). *Antimicrobial chemotherapy and vaccines*, 2<sup>nd</sup> edn. Volume II: Antimicrobial agents. Pittsburgh, PA: Esun Technologies, LLC, 2005:539-50
  139. Peloquin CA, Namdar R, Dodge AA, Nix DE. Pharmacokinetics of isoniazid under fasting conditions, with food, and with antacids. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3: 703-10
  140. McEvoy GK(ed). *AHFS drug information*. Bethesda, MD: American Society of Health-Systems Pharmacists, 2006
  141. Trnka L, Mison P, Bartmann K, Otten H. Experimental evaluation of efficacy. In: Bartmann K (ed.). *Antituberculosis drugs*. Berlin:Springer Verlag, 1988:31-232
  142. Saukkonen JJ, Bernardo J, Cohn D et al. Hepatotoxicity of tuberculosis therapy (HATT). *Am J Respir Crit Care med* 2006;174:935-52
  143. Peloquin CA, Vernon A. Antimycobacterial agents: rifamycins for mycobacterial infections. In: Yu VL, Edwards G, McKinnon PS, Peloquin C, Morse GD (eds.). *Antimicrobial chemotherapy and vaccines* 2<sup>nd</sup> edn. Volume II: Antimicrobial agents. Pittsburgh, PA: Esun Technologies, LLC, 2005:383-402
  144. Burman WJ, Gallicano K, Peloquin CA. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the rifamycin antibiotics. *Clin Pharmacokinet* 2001;40:327-41
  145. Iatsimirskaia E, tulebaev S, Storozhuk E et al. Metabolism of rifabutin in human enterocyte and liver microsomes: kinetic parameters, identification of enzyme systems, and drug interactions weith macrolides and antifungal agents. *Clin Pharmacol Ther* 1997;61:554-62
  146. McGregor MM, Olliaro P, Wolmarans L et al. Efficacy and safety of rifabutin in the treatment of patients with newly diagnosed pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1462-7

147. Tappero JW, Bradford WZ, Agerton TB et al. Serum concentrations of antimycobacterial drugs in patients with pulmonary tuberculosis in Botswana. *Clin Infect Dis* 2005;41:461-9
148. Perlman DC, Segal Y, Rosenkranz S et al. for the ACTG 309 Team. The clinical pharmacokinetics of pyrazinamide in HIV-infected persons with tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2004;38:556-64
149. US Centers for Disease Control and Prevention. Update: fatal and severe liver injuries associated with rifampicin and pyrazinamide for latent tuberculosis infection, and revisions in American Thoracic Society/CDC recommendations-United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2001;50:733-5
150. Peloquin CA, Bulpitt Ae, Jaresko GS et al. Pharmacokinetics of ethambutol under fasting conditions, with food, and with antacids. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:568-72
151. Peloquin CA. antituberculosis drugs: pharmacokinetics. In: heifets LB (ed.). *Drug susceptibility in the chemotherapy of mycobacterial infections*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991:89-122
152. Peloquin CA. Para-aminosalicylic acid. In: Yu VL, Edwards G, McKinnon PS. Peloquin C, Morse GD (eds.). *Antimicrobial chemotherapy and vaccines 2<sup>nd</sup> edn. Volume II: Antimicrobial agents*. Pittsburgh, PA: Esun Technologies, LLC, 2005: 551-8
153. Zhu M, Nix DE, Adam RD et al. Pharmacokinetics of cycloserine under fasting conditions, with orange juice, food, and antacids. *Pharmacotherapy* 2001;21:891-7
154. Namdar R, Peloquin CA. Ethionamide. In: Yu VL, Edwards G, McKinnon PS. Peloquin C, Morse GD (eds.). *Antimicrobial chemotherapy and vaccines 2<sup>nd</sup> edn. Volume II: Antimicrobial agents*. Pittsburgh, PA: Esun Technologies, LLC, 2005:533-8
155. Peloquin CA, Berning SE, Nitta AT et al. Aminoglycoside toxicity: daily versus thrice-weekly dosing for treatment of mycobacterial diseases. *Clin Infect Dis* 2004;38:1538-44
156. Berning SE. The role of fluoroquinolones in tuberculosis today. *Drugs* 2001;61:9-18



157. Owens RC Jr. Fluoroquinolone-associated dysglycemias: a tale of two toxicities. *Pharmacotherapy* 2005;25:1291-5
158. Spigelman M, Gillepsie S. Tuberculosis drug development pipeline: progress and hope: *Lancet* 2006;367:945-7
159. Nuermberger E, Rosenthal I, Tyagi S et al. Combination chemotherapy with the nitroimidazopyran PA-824 and first-line drugs in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2621-5
160. Hittel N. Nitro-dihydro-imidazooxazole derivative OPC-67683. The Second Annual Open Forum on Key Issues in TB Drug Development, London, UK, 12-13 December 2006
161. Nacy C. Diamine SQ109. The Second Annual Open Forum on Key Issues in TB Drug Development, London, UK, 12-13 December 2006
162. World Health Organization. Treatment of tuberculosis: Guidelines for national programmes, 2<sup>nd</sup> edn. Geneva:WHO, 1997
163. Sbarbaro J, Blomberg B, Chaulet P. Fixed-dose combinations formulations for tuberculosis treatment. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3:S286-8
164. ERS, WHO, IUATLD (Europe Region) Task Force. Tuberculosis management in Europe: Recommendations of a task force of the European Respiratory Society, the World Health Organization and the International Union against Tuberculosis and Lung Disease (Europe Region). *Eur Respir J* 1999;14:978-92
165. Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. Chemotherapy and management of tuberculosis in the United Kingdom: recommendations 1998. *Thorax* 1998;53:536-48
166. Stead WW. Tuberculosis among elderly persons as observed among nursing home residents. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;2:S64-S70
167. Whittington RM. Fatal hepatotoxicity of antitubercular chemotherapy. *Lancet* 1991;338:1083-4
168. Mitchell I, Wendon J, Fitt S, Williams R. Antituberculous therapy and acute liver failure. *Lancet* 1995;345:555-6
169. Fernandez-Villar A, Sopena B, Fernandez-Villar J et al. The influence of risk factors on the severity of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:1499-505

170. Wong WM, Wu PC, Yen MF et al. Antituberculosis drug-related liver dysfunction in chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 2000;31:201-6
171. Ungo JR, Jones D, Ashkin D et al. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: the role of hepatitis C virus and the human immunodeficiency virus. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1871-6
172. Steele M, Burk RF, DesPrez RM. Toxic hepatitis with isoniazid and rifampin. A meta-analysis. *Chest* 1991;99:465-71
173. Yew WW, Lee J, Wong PC, Kwan SYL. Tolerance of ofloxacin in treatment of pulmonary tuberculosis in presence of hepatic dysfunction. *Int J Clin Pharm Res* 1992;XII:173-8
174. Malone RS, Fish DN, Spiegel DM et al. the effect of hemodialysis on isoniazid, rifampin, pyrazinamide and ethambutol. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1580-4
175. Ellard GA. Chemotherapy of tuberculosis for patients with renal impairment. *Nephron* 1993;64:169-81
176. Lin TP, Suo J, Lee CN et al. short-course chemotherapy of pulmonary tuberculosis in pneumoconiotic patients. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:808-10
177. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and treatment of tuberculosis among patients infected with human immunodeficiency virus: principles of therapy and revised recommendations. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998;47(RR-20):1-58
178. Centers for Disease Control and Prevention. Updated guidelines for the use of rifabutin or rifampin for the treatment and prevention of tuberculosis among HIV-infected patients taking protease-inhibitors or non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49:185-9
179. Hong Kong Chest Service/British Medical research Council. Five-year follow-up of a controlled trial of five 6-month regimens of chemotherapy for pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:1339-42
180. Babu Swai O, Aluoch JA, Gitwui WA et al. controlled clinical trial of a regimen of two durations for the treatment of isoniazid resistant pulmonary tuberculosis. *Tubercle* 1988;69:5-14
181. Barnes PF, Bloch AB, Davidson PT, Snider DE jr. Tuberculosis in patients with immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1991;324:1644-50

182. American Thoracic Society/ Centers for Disease Control and Prevention/ Infectious Diseases Society of America. Treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:603-62
183. Dye C, Williams BG, Espinal MA, Raviglione MC. Erasing the world's slow stain: strategies to beat multidrug-resistant tuberculosis. *Science* 2000;295:2042-6
184. Farmer P, Kim JY. Community based approaches to the control of multidrug resistant tuberculosis: introducing "DOTS-plus". *Br Med J* 1998;317:671-4
185. World Health Organization. Treatment of tuberculosis. Guidelines for National programmes, 3<sup>rd</sup> edn. WHO/CDS/TB/2003.313,2003
186. Yew WW, Chan CK, Leung CC et al. Comparative roles of levofloxacin and ofloxacin in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: preliminary results of a retrospective study from Hong-Kong. *Chest* 2003;124:1476-81
187. Johnson BJ, Bekker LG, Rickman R et al. rhuIL-2 adjunctive therapy in multidrug resistant tuberculosis: a comparison of two treatment regimens and placebo. *Tuber Lung Dis* 1997;78:195-203
188. Giosue S, Casarini M, Ameglio F et al. Aerolized interferon-alpha treatment in patients with multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *Eur Cytokine Netw* 2000;11:99-104
189. Condos R, Rom WN, Schluger NW. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon- $\gamma$  via aerosol. *Lancet* 1997;349:1513-15
190. Stanford JL, Stanford CA, Grange JM et al. Does immunotherapy with heat-killed *Mycobacterium vaccae* offer hope for the treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis? *Respir Med* 2001;95:444-7
191. Case definition for extensively drug-resistant tuberculosis. *Wkly Epidemiol Rec* 2006;81:408
192. LoBue P. Extensively drug-resistant tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis.*2009;22(2):167-73
193. Migliori GB, Eker B, Richardson MD et al. A retrospective TBNET assessment of linezolid safety, tolerability and efficacy in multi-drug resistant tuberculosis. *Eur Respir J* 2009;34:387-393
194. Dravnic G, Cain K.P, Holtz T.H et al. Adjunctive resectional lung surgery for extensively drug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J* 2009;34:180-83

195. Branscheid D, Albrecht CM, Diemel KD. Surgical therapy of tuberculosis. *Internist (Berlin)*2003;44(11):1406-12
196. Rodriguez M, Munita Sepuldeva JM, Perez D et al. Surgery for pulmonary tuberculosis. Review of 33 operated patients. *Rev Med Chil* 2009;137(2):234-9
197. Treasure RL, Seaworth BJ. Current role of surgery in *Mycobacterium tuberculosis*. *Ann Thorac Surg* 1995;59:1405-7
198. Henderson AH, Pearson JEG. Treatment of bronchopulmonary aspergillosis with observations on the use of natamycin. *Thorax* 1968;23:519-23
199. Watanebe Y, Shimizu J, Oda M et al. Results in 104 patients undergoing bronchoplastic procedures for bronchial lesions. *Ann Thorac Surg* 1990;50:607-14
200. Goldstraw P. Mediastinal exploration by mediastinoscopy and mediastinotomy. *Br J Dis Chest* 1988;82:111-20
201. Mantoux MC. La voie intradermique en tubercalinothérapie. *Presse Med* 1912;20:146-8
202. Tarlo SM, Day JH, Mann P, Day MP. Immediate hypersensitivity to tuberculin in vivo and in vitro studies. *Chest* 1977;71:33-7
203. Morrison JP. Lymphangitis after tuberculin tests. *Br Med J* 1984;289:413
204. World Health Organization. The WHO standard tuberculin test. Geneva: World Health Organization, 1963
205. Caiaffa WT, Graham NMH, Galai N et al. Instability of delayed-type hypersensitivity skin test anergy in human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* 1995;155:2111-117
206. Zahrani KA, Jahdali HA, Poirier L et al. Accuracy and utility of commercially available amplification and serologic tests for the diagnosis of minimal pulmonary tuberculosis. *Am J Resp Crit Care Med* 2000;162: 1323-9
207. Stead WWW, To T. The significance of the tuberculin skin test in elderly persons. *Ann Int Med* 1987;107:837-42
208. Wang L, Turner MO, Elwood RK et al. A meta-analysis of the effect of bacilli Calmette-Guerin vaccination on tuberculin skin measurements. *Thorax* 2002;57: 804-9

209. Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D. False positive tuberculin skin tests- what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuber Lung Dis* 2006;10:1-13
210. Cauthen GM, Snider DE, Onorato IM. Boosting of tuberculin sensitivity among Southeast Asian refugees. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:1597-600
211. American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:725-735
212. Mazurek G, Jereb J, LoBue P et al. Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis; Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC; Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold Test for detecting *Mycobacterium Tuberculosis* infection, United States. *Morb Mortal Wkly Rep* 2005;54:49-55
213. Royal College of Physicians. Tuberculosis: National clinical guidelines for diagnosis, management, prevention, and control. London: <http://www.nice.org.uk>, 2006 (published September 2005)
214. Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Annals Intern Med* 2007;146:340-54
215. Morán-Mendoza O, Marion SA, Elwood K et al. Tuberculin skin test and risk of tuberculosis development: a large population- based study in contacts. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:1014-20
216. 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 Organ* 1982;60:555-64
217. 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:S221-47
218. National Collaborating centre for Chronic Conditions. Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. London: Royal College of Physicians, 2006
219. Snider De Jr, Caras GJ. Isoniazid-associated hepatitis deaths: a review of available information. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:494-7

220. Leuenberger P, Zellweger JP. Drugs used in tuberculosis and leprosy. In: Dukes MNG, Aronson JK (eds). *Meyler's side effects of drugs*, 14<sup>th</sup> edn. Oxford: Elsevier Science, 2001:1005-1029
221. Ormerod LP. Rifampicin and isoniazid prophylactic chemotherapy for tuberculosis. *Arch Dis Child* 1998;78:169-71
222. Hong Kong Chest Service TRCM. A double-blinded placebo- controlled clinical trial of three antituberculosis chemoprophylaxis regimens in patients with silicosis in Hong Kong. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:36-41
223. American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention. Update: fatal and severe liver injuries associated with rifampin and pyrazonamide for latent tuberculosis infection, and revisions in American Thoracic Society/ CDC recommendations- United States 2001. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1319-20
224. Rieder HL. Preventing latent tuberculosis among HIV- infected patients: efficacious and effective, yet inefficient? *Clin Infect Dis* 2007;44:103-104
225. Diel R, Nienhaus A, Schaberg T. Cost-effectiveness of isoniazid chemoprevention in close contacts. *Eur Respir J* 2005; 26:465-73
226. Marfan A. De l' immunite conferee par la guerison d' une tuberculose locale pour le phthisie pulmonaire. *Arch Gen Med* 1886;1:423,575
227. Calmette A. Preventive vaccination against tuberculosis with BCG. *Proc Roy Soc Med* 1931;24:85-94
228. Sakula A. BCG: who were Calmette and Guérin? *Thorax* 1993;38:806-12
229. Weill- Hallé B, Turpin R. Premiers essais de vaccination antituberculeuse de l' enfant par le bacilli Calmette- Guérin (BCG). *Bull Soc Méd Hôpitaux (France)* 1925;49:1589-601
230. World Health Organization. BCG in immunization programmes. *Wkly Epidem Rec* 2001;76:33-9
231. World Health Organization: BCG vaccine. *Weekly epidemiological record* No4, 2004;79:25-40
232. Simberkoff MS. Vaccination for pulmonary infections. In *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders*. McGraw-Hill, New York, 1998;pp.1959-1966

233. Greenberg PD, Lax KG, Schechter CB. Tuberculosis in house staff. A decision analysis comparing the tuberculin screening strategy with the BCG vaccination. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:490-5
234. Trnka L, Dankova D, Zitova J et al. Survey of BCG vaccination policy in Europe: 1994-96. *Bulletin of the World Health Organization* 1998;76(1):85-91
235. Infuso A, Falzon D. European survey of BCG vaccination policy and surveillance in children 2005. *Eurosurveillance* 2006;11(3):pii=604
236. Fine PEM, Carneiro IAM, Milstien JB, Clements CJ. Issues relating to the use of BCG in immunization programmes. A discussion document. World Health Organization Document, WHO/VetB/99.23,1999:1-42
237. FitzGerald JM. Management of adverse reactions to bacille Calmette- Guérin vaccine. *Clin Infect Dis* 2000;31(Suppl.): S75-6
238. Lotte A, Wasz-Höckert O, Poisson N et al. Second IUATLD study on complications induced by intradermal BCG- vaccination. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis* 1988;63:47-59
239. Colditz GA, Brewer T, Berkley C et al. Efficacy of Bcg in the prevention of tuberculosis: Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 1994;271:698-702
240. Fine PEM. Variation in protection by BCG: Implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1995;346:1339-1345
241. Rosenthal SR, Loewinsohn E, Graham ML et al. BCG vaccination against tuberculosis in Chicago. A twenty-year study statistically analysed. *Pediatrics* 1961;28:624-41
242. Zodpey SP, Maldhure BR, Dehankar AG, Shrikhande SN. Effectiveness of bacillus Calmette- Guérin (BCG) vaccination against extra-pulmonary tuberculosis: a case-control study. *J Commun Dis* 1996;28:77-84
243. Ferguson SR, Simes AB. BCG vaccination of Indian infants in Saskatchewan. *Tubercle* 1949;30:5-11
244. Rosenthal SR, Loewinsohn E, Graham ML et al. BCG vaccination in tuberculous households. *Am Rev Respir Dis* 1961;84:690-704
245. Sepulveda RL, Parcha C, Sorensen RU. Case-control study of the efficacy of BCG immunization against pulmonary tuberculosis in young adults in Santiago, Chile. *Tuberc Lung Dis* 1992;73:372-7

246. Houston S, Fanning A, Soskolne CL, Fraser N. The effectiveness of bacillus Calmette- Guérin (BCG) vaccination against tuberculosis. A case- control study in treaty Indians, Alberta, Canada. *Am J Epidemiol* 1990;131:340-8
247. Scriba TJ, Tameris M, Mansoor N et al. Dose-finding study of the novel tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy BCG-vaccinated infants. *J Infect Dis* 2011;203(12):1832-43
248. Menzies RI. Tuberculin skin testing. In: Reichman LB, Hershfield ES, eds. *Tuberculosis: a comprehensive international approach*. NewYork: Marcel Dekker, 2000:279-322
249. Madhukar Pai, Keertan Dheda, Cunninham J et al. T-cell assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: moving the research agenda forward. *Lancet Infect Dis* 2007;7:428-438
250. QuantiFERON-TB Gold in Tube [package insert]. Victoria, Australia: Cellestis;2007
251. QuantiFERON-TB Gold assay notes [package insert]. Victoria, Australia: Cellestis 2006
252. T-SPOT.TB [package insert]. Oxfordshire, UK: Oxford Immunotec;2005
253. Ferrara G, Losi M, Meacci M et al. Routine hospital use of a new commercial whole blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:631-5
254. Brock I, Ruhwald M, Lundgren B et al. Latent tuberculosis in HIV positive diagnosed by the M. tuberculosis specific interferon-gamma test. *Respir Res* 2006;7:56
255. Dheda K, Lalvani A, Miller RF et al. Performance of a T-cell-based diagnostic test for tuberculosis infection in HIV- infected individuals is independent of CD4 cell count. *AIDS* 2005;19: 2038-41
256. Ponce de Leon D, Acevedo- Vasquez E et al. Comparison of an interferon- $\gamma$  assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in TB endemic population. *J Reumatol* 2008;35(5):776-81
257. Takahashi H, Shigehara K, Yamamoto M et al. Interferon- $\gamma$  assay for detecting latent tuberculosis infection in rheumatoid arthritis patients during infliximab administration. *Rheumatol Int* 2007;7:361-2



258. Ferrara G, Losi M, D'Amico R et al. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *Lancet* 2006;367:1328-34
259. Lee JY, Choi HJ, Park IN et al. Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing *Mycobacterium Tuberculosis* infection. *Eur Respir J* 2006;28:24-30
260. Richeldi L, Losi M, D' Amico R et al. Performance of tests for latent tuberculosis in different groups of immunocompromised patients. *Chest* 2009;136(1):198-204
261. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic Review: T- Cell- based Assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: An update. *Ann Intern Med* 2008;149:177-184
262. Dheda K, van Zyl Smit R, Badri M et al. T-cell interferon- $\gamma$  release assays for the rapid immunodiagnosis of tuberculosis: a clinical utility in high-burden vs. low-burden settings. *Curr Opin Pulm Med* ;15:188-200
263. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS et al. Childhood pulmonary tuberculosis: old wisdom and new challenges. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1078-1090
264. Strumpf IJ, Tsang AY, Sayre JW et al. Re-evaluation of sputum staining for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1979;119:599-602
265. Lalvani A, Millington K. T cell-based diagnosis of childhood tuberculosis infection. *Curr Opin Infect Dis* 2007;20: 264-271
266. Dogra S, Narang P, Mendiratta DK et al. Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect* 2007;54:267-276
267. Liebeschuetz S, Bamber S, Ewer K et al. Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T-cell based assay: a prospective cohort study. *Lancet* 2004;364:2196-2203
268. Connell TG, Curtis N, Ranganathan SC et al. Performance of a whole blood interferon gamma assay for detecting latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* in children. *Thorax* 2006;61: 616-620

269. Ewer K, Deeks J, Alvarez L et al. Comparison of T-cell based assay with tuberculin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 2003;361:1168-73
270. Nakaoka H, Lawson L, Squire SB et al. Risk for tuberculosis among children. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1383-88
271. Kampmann B, Whittaker E, Williams A et al. Interferon- $\gamma$  release assays do not identify more children with active tuberculosis than the tuberculin skin test. *Eur Resp J* 2009;33:1374-1382
272. Pavić I, Zrinski Topić R et al. Interferon-  $\gamma$  release assay for the diagnosis of latent tuberculosis in children younger than 5 years of age. *Pediatr Infect Dis J* 2011 May 12
273. Machingaidze S, Wiysonge CS, Gonzalez – Angulo Y et al. The utility of an Interferon Gamma Release Assay for Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection and Disease in children: a Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30(8):694-700
274. Kobashi Y, Mouri K, Yagi S et al. Clinical utility of the QuantiFERON TB-2G test for elderly patients with active tuberculosis. *Chest* 2008;133:1196-1202
275. Kobashi Y, Mouri K, Yagi S et al. Clinical utility of a Tcell-based assay in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Respirology* 2009;14:276-81
276. Ravn P, Munk M, Andersen A et al. Prospective evaluation of a whole blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT -6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. *Clin diagn Lab Immunol* 2005;12:491-6
277. Dewan P, Grinsdale J, Kawamura L. Low sensitivity of a whole blood interferon- $\gamma$  release assay for detection of active tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2007;44:69-73
278. Aichelburg M, Rieger A, Breitenecker F et al. Detection and prediction of active tuberculosis disease by a whole- blood interferon- $\gamma$  release assay in HIV-1 infected individuals. *Clinical Infectious Diseases* 2009;48:954-62
279. Dheda K, Lalvani A, Miller R et al. Performance of a T-cell based diagnostic test for tuberculosis infection in HIV- infected individuals is independent of CD4 cell count. *AIDS* 2005;19:2031-2041

280. Chapman AL, Munkantta M, Wilkinson KA et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*- specific T cells. *AIDS* 2002;16:2285-2293
281. Carrara S, Vicenti D, Amicosante M et al. Immunodiagnosis of tuberculosis in HIV+ subjects with a clinical suspicion of active disease. *Eur Respir J* 2004;24:34s
282. Piana F, Codecasa L, Besozzi G. Use of commercial interferon- $\gamma$  assays in immunocompromised patients for tuberculosis diagnosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:130
283. Pai M, Riley L, Colford Jr J. Interferon- $\gamma$  assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004;4:761-76
284. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen specific T cells. *Lancet* 2001;357:2017-21
285. Brock I, Munk ME, Kok-Jensen A et al. Performance of whole blood IFN- $\gamma$  test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific ESAT-6 and CFP-10. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:462-7
286. Johnson PD, Stuart RL, Grayson ML et al. Tuberculin-purified protein derivative-, MPT-6K- and ESAT-6 stimulated gamma interferon responses in medical students before and after *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and in patients with Tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:934-37
287. Chee C, Gan S, KhinMar K et al. Comparison of sensitivities of two commercial gamma interferon release assays for pulmonary tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2008;46:1935-40
288. Porsa E, Cheng L, Seale MM et al. Comparison of a new ESAT-6/ CFP10 peptide-based gamma interferon assay and a tuberculin skin test for tuberculosis screening in a moderate-risk population. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:53-8
289. Brock I, Weldingh K, Lillebaek T et al. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:65-69
290. Richeldi L, Ewer K, Losi M et al. T cell -based tracking of multidrug resistant tuberculosis infection after brief exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:288-95

291. Lein AD, von Reyn CF, Ravn P et al. Cellular immune responses to ESAT-6 discriminate between patients with pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex and those with pulmonary disease due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:606-9
292. Rolinck- Werninghaus C, Magdorf K, Stark K et al. The potential of recombinant antigens ESAT6, MPT63 and mig for specific discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. avium* infection. *Eur J Pediatr* 2003;162:534-6
293. Mazurek GH, LoBue PA, Daley CL et al. Comparison of a whole- blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing for detecting latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *JAMA* 2001;286:1740-47
294. Arend SM, van Meijgaarden KE, de Boer K et al. Tuberculin skin testing and in vitro T cell responses to ESAT-6 and culture filtrate protein 10 after infection with *Mycobacterium marinum* or *M. kansasii*. *J Infect Dis* 2002;186:1797-807
295. Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KL et al. Identification and characterization of the ESAT-6 homologue of *Mycobacterium leprae* and T-cell cross-reactivity with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2002;70:2544-48
296. van Zyl-Smit R, Pai M, Peprah k et al. Within-subject variability and boosting of T-cell interferon- $\gamma$  responses after tuberculin skin testing. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:49-58
297. Naseer A, Naqvi S, Kapmann B. Evidence for boosting *Mycobacterium tuberculosis*- specific IFN- $\gamma$  responses at 6 weeks following tuberculin skin testing. *Eur Respir J* 2007;29:1282-3
298. Igari H, Watanabe A, Sato T. Booster phenomenon of quantiFERON-TB Gold after prior intradermal PPD injection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:788-791
299. Vilaplana C, Ruiz-Manzano J, Gil O et al. The tuberculin skin test increases the responses measured by T cell interferon- $\gamma$  release assay. *Scand J Immunol* 2008;67:610-617
300. Choi JC, Shin JW, Kim JY et al. The effect of previous tuberculin skin test on the follow up examination of whole-blood interferon- $\gamma$  assay in the screening for latent tuberculosis infection. *Chest* 2008;133:1415-1420

301. Richeldi L, Ewer K, Losi M et al. Repeated tuberculin skin testing does not induce false positive ELISPOT results. *Thorax* 2006;61:180
302. Leyten EMS, Prins C, Bossink AWJ et al. Effect of tuberculin skin testing on a *Mycobacterium tuberculosis*-specific interferon- $\gamma$  assay. *Eur Respir J* 2007;29:1212-16
303. Nguyen M, Perry S, Parsonnet J. QuantiFERON-TB predicts tuberculin skin test boosting in U.S. foreign born. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9:985-991
304. Pai M, Joshi R, Dogra S et al. T-cell assay conversions and reversions among household contacts of tuberculosis patients in rural India. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:84-92
305. Pai M, Joshi R, Dogra S et al. Serial testing of health care workers for tuberculosis using interferon- $\gamma$  assay. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:349-355
306. Cararra S, Vincenti D, Petrosillo N et al. Use of a T cell-based assay for monitoring efficacy of antituberculosis therapy. *Clin Infect Dis* 2004;38:754-56
307. Lalvani A, Nagvenkar P, Udawadia Z et al. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigen suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. *J Infect Dis* 2001;183:469-77
308. Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P et al. Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. *J Immunol* 2001;167:5217-25
309. Al-Attayah R, Mustafa AS, Abal AT et al. Restoration of mycobacterial antigen-induced proliferation and interferon-gamma responses in peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients upon effective chemotherapy. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;38:249-56
310. Ulrichs T, Anding R, Kaufmann SH et al. Numbers of IFN-gamma producing cells against ESAT 6 increase in tuberculosis patients during chemotherapy. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002;4:1181-83
311. Fietta A, Meloni F, Cascina A et al. Comparison of a whole-blood interferon-gamma assay and tuberculin skin testing in patients with active tuberculosis and individuals at high or low risk of mycobacterium tuberculosis infection. *Am J Infect Control* 2003;31:347-53

312. Stuart RL, Olden D, Johnson PD et al. Effect of anti-tuberculosis treatment on the tuberculin interferon-gamma response in tuberculin skin test (TST) positive health care workers and patients with tuberculosis. *Int J Tuerc Lung Dis* 2000;4:555-61
313. Ravn P, Demissie A, Egualé T et al. human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1999;179:637-45
314. Sauzullo I, Mengoni F, Lichtner M et al. In vivo and in vitro effects of antituberculosis treatment on mycobacterial interferon- $\gamma$  T cell response. *PLoS ONE* 4(4):e 5187
315. Ribeiro S, Dooley K, Hackman J et al. T-SPOT.TB responses during treatment of pulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis* 2009;9:23
316. Aiken AM, Hill PC, Fox A et al. Reversion of the ELISPOT test after treatment in Gambian tuberculosis cases. *BMC Infect Dis* 2006;6:66
317. Kobashi Y, Mouria K, Yagia S et al. Transitional changes in T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens during treatment. *Journal of Infection* 2009;58:197-204
318. US Food and Drug Administration. QuantiFERON-TB-P010033. Summary of safety and effectiveness. [www.fda.gov/cdrh/pdf/p010033b.doc](http://www.fda.gov/cdrh/pdf/p010033b.doc)(accessed Oct 28, 2004)
319. Detjen AK, Loebenberg L, Grewal HM et al. Short-term reproducibility of a commercial interferon-gamma release assay. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1170-5
320. Bellete B, Coberly J, Barnes GL et al. Evaluation of a whole-blood interferon- $\gamma$  release assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in 2 study populations. *Clin Infect Dis* 2002;34:1449-56
321. T-Spot.TB. An aid in the diagnosis of tuberculosis infection. Package insert for in vitro diagnostic use. Oxford: Oxford Immunotech, 2006
322. Hooper C, Lee Y.C, Maskell N. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of TB pleural effusion: hype or real hope? *Curr Opin Pulm Med* 2009;15:358-365
323. Ariga H, Kawabe Y, Nagai H et al. Diagnosis of active tuberculosis serositis by antigen-specific interferon- $\gamma$  response of cavity fluid cells. *Clin Infect Dis* 2007;45:1559-1567

324. Losi M, Bossink A, Codecasa L et al. Use of a T-cell interferon- $\gamma$  release assay for the diagnosis of tuberculosis pleurisy. *Eur Respir J* 2007;30:1173-1179
325. Baba K, Somes S, Hoosen AA et al. Evaluation of immune responses in HIV infected patients with pleural tuberculosis by the QuantiFERON TB Gold interferon-gamma assay. *BMC Infect Dis* 2008;8:35
326. Chegou N, Walzl G, Bolliger C et al. Evaluation of adapted whole blood interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of pleural tuberculosis. *Respiration* 2008;76:131-138
327. Jafari C, Thijsen S, Sotgin G et al. Bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot for a rapid diagnosis of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:666-673
328. Jafari C, Ernst M, Kalsdorf B et al. Rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis by bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:1048-1054
329. Strassburg A, Jafari C, Ernst M et al. Rapid diagnosis of pulmonary TB by BAL enzyme-linked immunospot assay in immunocompromised host. *Eur Respir J* 2008;31:1132-1135
330. Thomas MM, Hinks TS, Raghuraman S et al. Rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis meningitis by enumeration of cerebrospinal fluid antigen-specific T-cells. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;12(6):651-657
331. Luca MC, Petrovici CM, Vata A et al. Gamma interferon testing in blood and cerebrospinal fluid-rapid method for the diagnosis of tuberculosis meningitis. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2008;112:108-110
332. Uchibori A, Miyazaki T, Ariga H. Interferon-gamma release assay in cerebrospinal fluid of a patient with tuberculosis meningitis: a case report. *Rhinso Shinkeigaku* 2009;49(7):428-431
333. Biglino A, Crivelli P, Concialdi E et al. Clinical usefulness of ELISPOT assay on pericardial fluid in a case of suspected tuberculous pericarditis. *Infection* 2008;36:601-604
334. Caputo D, Alloni R, Garberini A et al. Experience with two cases of intestinal tuberculosis: utility of the QuantiFERON- TB Gold test for diagnosis. *Surg Infections* 2008; 9(3):407-410

335. Kim S, Cho O, Park SJ et al. Diagnosis of abdominal tuberculosis by T-cell-based assays on peripheral blood and peritoneal fluid mononuclear cells. *Journal of Infection* 2009 (ahead of print)
336. Pai M, Kalantri S, Dheda D. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part 1. Latent Tuberculosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2006;6:413-422

## 7.2 ΒΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

### Α΄ ΦΑΣΗ

1. Pai M, Dheda K, Cunningham J et al. T-cell assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: moving the research agenda forward. *Lancet Infect Dis* 2007;7:428-438
2. American Thoracic Society. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:S211-47
3. Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: New tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med* 2007;146:340-354.
4. Farhat M, Greenaway C, Pai M, et al. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10:1192-1204.
5. Fine PEM. The BCG story: lessons from the past and implications for the future. *Rev Infect Dis* 1989;11: S353-359.
6. Trnka L, Dankova D, Zitova J et al. Survey of BCG vaccination policy in Europe: 1994-96. *Bulletin of the World Health Organization* 1998;76(1):85-91
7. Kipfer B, Reichmutb M, Büchler M et al. Tuberculosis in a Swiss Army training camp: contact investigation using an interferon gamma release assay. *Swiss Med Wkly* 2008;138:267-272
8. Choi C, Hwang S, Lee C et al. Latent tuberculosis infection in a military setting diagnosed by whole- blood interferon- $\gamma$  assay. *Respirology* 2007;12:898-901



9. Franken W, Timmermans J, Prins C et al. Comparison of Mantoux and QuantiFERON TB Gold tests for diagnosis of latent tuberculosis infection in army personnel. *Clinical and Vaccine Immunology* 2007;14:477-480
10. Diel R, Nienhans A, Lange C et al. Tuberculosis contact investigation with a new specific blood test in a low incidence population containing a high proportion of BCG vaccinated persons. *Respiratory Research* 2006;7:77
11. Kang Y, Lee WH, Yoan HI, et al. 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;293:2756-2761.
12. Mazurek GH, Zajdowicz MJ, Hankinson AL, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis infection in United States Navy recruits using the tuberculin skin test or whole-blood interferon-gamma release assays. *Clin Infect Dis*. 2007;45:826-836.
13. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic Review: T-Cell-based Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Update. *Ann Intern Med* 2008;149:177-184.
14. Gerogianni I, Papala M, Klapsa D et al. Whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection in an unselected Greek population. *Respirology* 2008; 13:270-274
15. Theodoropoulos P, Dimadi M, Constantopoulos SH. Calculation of new cases of tuberculosis from the consumption of anti-tuberculosis medications: comparison with notification rates. *Respiration* 1992;59:64
16. World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2006. WHO/ HTM/TB/2006.362. Geneva, Switzerland. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2006/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2006/en/index.html). Accessed April 2009.
17. Cook V, Fitzgerald JM, Menzies D. Clinical interpretation of tests for latent tuberculosis infection. In: Davies PDO, Barnes PF, Gordon SB, eds. *Clinical Tuberculosis*. London, UK: Hodder Arnold, 2008: pp393-410.
18. Wang L, Turner MO, Elwood RK, et al. A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guérin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax* 2002; 57:804-809

19. Menzies D. What does tuberculin reactivity after Bacille Calmette-Guerin vaccination tell us? *Clin Infect Dis* 2000;31(Suppl 3):S71-74.
20. Dascalopoulos G, Constantopoulos SH. Tuberculin sensitivity after successful BCG vaccination. *Eur Respir J* 1989;2:756S
21. Diel R, Nienhaus A, Lange C, et al. 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.
22. Lee SS, Liu YC, Huang TS, et al. Comparison of the interferon-gamma release assay and the tuberculin skin test for contact investigation of tuberculosis in BCG-vaccinated health care workers. *Scand J Infect Dis* 2008;40:373-380.
23. Haverkamp MH, Arend SM, Lindeboom JA, et al. Nontuberculous mycobacterial infection in children: a 2-year prospective surveillance study in the Netherlands. *Clin Infect Dis* 2004; 39:450-456.
24. von Reyn CF, Horsburgh CR, Olivier KN, et al. Skin test reactions to *Mycobacterium tuberculosis* purified protein derivative and *Mycobacterium avium* sensitin among health care workers and medical students in the United States. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5:1122-1128
25. Dascalopoulos G, Loukas S, Constantopoulos SH. Wide geographic variations of sensitivity to MOTT sensitins in Greece. *Eur Respir J* 1995; 5:715-717.
26. Nikolaou S, Papaventsis D, Karabela S et al. Routine non-tuberculous mycobacteria detection and molecular identification, Athens, Greece, 2005-2009. 20<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ECCMID)
27. Detjen AK, Keil T, Roll S, et al. 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; 45:322-328
28. Pollock NR, Campos-Neto A, Kashino S, et al. Discordant QuantiFERON-TB Gold test results among US healthcare workers with increased risk of latent tuberculosis infection: a problem or solution? *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29:878-886.
29. Hill PC, Brookes RH, Fox A, et al. Large-scale evaluation of enzyme-linked immunospot assay and skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*

- infection against a gradient of exposure in The Gambia. *Clin Infect Dis* 2004;38:966-973.
30. Lalvani A. Counting antigen-specific T cells: a new approach for monitoring response to tuberculosis treatment? *Clin Infect Dis* 2004;38:757-59
  31. Carrara S, Vincenti D, Petrosillo N et al. Use of a T cell-based assay for monitoring efficacy of antituberculosis therapy. *Clin Infect Dis* 2004;38:754-56
  32. Leyten EM, Mulder B, Prins C et al. Use of enzyme-linked immunospot assay with Mycobacterium tuberculosis-specific peptides for diagnosis of recent infection with M tuberculosis after accidental laboratory exposure. *J Clin Microbiol* 2006;44:1197-201
  33. Brock I, Weldingh K, Lillebaek T et al. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:65-69.
  34. Pai M, Gokhale K, Joshi R, et al. Mycobacterium tuberculosis infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing. *JAMA* 2005;293:2756-2785.
  35. Hill PC, Brookes RH, Fox A, et al. Longitudinal assessment of an ELISPOT test for Mycobacterium tuberculosis infection. *PLoS Med* 2007; 4:e192.
  36. Pai M, Joshi R, Dogra S, et al. Serial testing of health care workers for tuberculosis using interferon-gamma assay. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 349-355
  37. Pai M, O'Brien R. Serial testing for tuberculosis: can we make sense of T-cell assay conversions and reversions? *PLoS Med* 2007; 4: e 208.
  38. Saukkonen J, Cohn D, Jasmer R et al. An Official ATS statement: Hepatotoxicity of Antituberculosis Therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:935-952
  39. LoBue PA, Moser KS. Isoniazid- and rifampin- resistant tuberculosis in San Diego County, California, United States, 1993-2002. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9: 501-506
  40. Nolan SM, Goldberg S, Buskin S. Hepatotoxicity associated with isoniazid preventive therapy: a 7-year survey from a public health tuberculosis clinic. *JAMA* 1999;281:1014-1018

41. Fountain FF, Tolley E, Chrisman CR, Self TH. Isoniazid hepatotoxicity associated with treatment of latent tuberculosis infection: a 7-year evaluation from a public health tuberculosis clinic. *Chest* 2005;128:116-123
42. McNab BD, Marciniuk DD, Alvi RA et al. Twice-weekly isoniazid and rifampin treatment of latent tuberculosis infection in Canadian plains Aborigines. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:989-993
43. Steele MA, Burk RF, DesPrez RM. Toxic hepatitis with isoniazid and rifampin: a meta-analysis. *Chest* 1991;99:465-471

#### B' ΦΑΣΗ

1. Stead WW. Tuberculosis among elderly persons, as observed among nursing home residents. *Int Tuberc Lung Dis* 1998;2:S64-S70
2. Behr A, Hopewell PC, Paz EA et al. Predictive value of contact investigation for identifying recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:465-469
3. Canadian Tuberculosis Committee. Updated recommendations on interferon gamma release assays for latent tuberculosis infection. An Advisory Committee Statement (ACS). *Can Commun Dis Rep* 2008;34:1-13
4. CDC. Updated Guidelines for using interferon gamma release assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection- United States, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010;59(RR-5):1-25
5. American Thoracic Society; Centers for Disease Control and Prevention; Council of the Infectious Disease Society of America. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:S221-S247
6. Cellestis Limited QuantiFERON TB Gold (in tube method) [package insert] [on-line]. Available at [http://www.celestis.com/IRM/content/aust/qtfproducts\\_tbgoldintube.html](http://www.celestis.com/IRM/content/aust/qtfproducts_tbgoldintube.html)/Accessed December 8,2010

7. Van Zyl-Smit R, Pai M, Peprah K et al. Within-subject variability and boosting of T cell interferon- $\gamma$  responses after tuberculin skin testing. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:49-58
8. NICE. Clinical guideline 33. Tuberculosis clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. London: National Institute for Health and Clinical Excellence, 2006[On line]. Available at <http://www.nice.org.uk/page.aspx?o=CG033NICE.guideline>. Accessed February 22, 2007
9. Van den Brande R. Revised guidelines for the diagnosis and control of tuberculosis: Impact on management in the elderly. *Drugs Aging* 2005; 22: 665-686
10. Rajagopalan S, Yoshikawa TT. Tuberculosis in the elderly. *Z Gerontol Geriatr* 2000;33:374-380
11. Dutt AK, Stead WW. Tuberculosis in the elderly. *Med Clin North Am* 1993;77:1353-68
12. Gisselbrecht M. Tuberculosis in elderly persons living in institutions. *Rev Mal Respir* 2004;21:S106-S113
13. Ijah K, Dillaha J, Yang Z et al. Unrecognized tuberculosis in a nursing home causing death with spread of tuberculosis in the community. *J Am Geriatr Soc* 2002;50:1213-1218
14. Forssman B, Gupta L, Mills K. A tuberculosis contact investigation involving two private nursing homes in inner Western Sydney in 2004. *NSW Public Health Bull* 2006;17:44-47
15. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis: recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC. *MMWR Recomm Rep* 2005;54(RR-15):1-47
16. Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. Control and prevention of tuberculosis in the United Kingdom. Code of practice 2000. *Thorax* 1993;48:1257-1260
17. Luetkemeyer AF, Charlebois ED, Flores LL et al. Comparison of an interferon- $\gamma$  release assay with tuberculin skin testing in HIV- infected individuals. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:737-742

18. Kobashi Y, Mouri K, Obase Y et al. Clinical evaluation of QuantiFERON TB 2G test for immunocompromised patients. *Eur Respir J* 2007;30:945-950
19. Nisar M, Williams CSD, Ashby D et al. Tuberculin testing in residential homes for the elderly. *Thorax* 1993;48:1257-1260
20. Grzybowski S, Allen EA. The challenge of tuberculosis in decline: A study based on the epidemiology of tuberculosis in Ontario, Canada. *Am Rev Respir Dis* 1964;90:707-720
21. Saltzman RL, Peterson PK. Immundeficiency in the elderly. *Rev Infect Dis* 1987;9:1127-1135
22. Behr MA, Warren SA, Salamon H et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* 1999;353:444-449
23. Pai M, Dheda K, Cunningham J et al. T-cell assays for the research agenda forward. *Lancet Infect Dis* 2007;7:428-438
24. Diel R, Loddenkemper R, Meywald- Walter K et al. Predictive value of a whole-blood IFN- $\gamma$  assay for the development of active TB disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1164-1170
25. Diel R, Loddenkemper R, Meywald- Walter K et al. Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-GOLD In tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest* 2009;135:1010-1018
26. Diel R, Nienhaus A, Loddenkemper R. Cost- effectiveness of interferon- $\gamma$  release assay screening for latent tuberculosis infection treatment in Germany. *Chest* 2007;131:1424-1434